



Sara Maria de Almeida Beijinho

Licenciada em Biotecnologia

Avaliação longitudinal das concentrações solúveis de CD40L e de marcadores hemorreológicos na doença inflamatória aguda

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica pela
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Orientador: Doutora Patrícia Napoleão, Instituto de Medicina Molecular

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Carlos
Salgueiro

Arguente: Doutora Maria Teresa Ferreira
Marques Pinheiro

Vogal: Doutora Patrícia Napoleão



Outubro 2014

Sara Maria de Almeida Beijinho

Licenciada em Biotecnologia

**Avaliação longitudinal das concentrações solúveis de
CD40L e de marcadores hemorreológicos na doença
inflamatória aguda**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica pela
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Orientador: Doutora Patrícia Napoleão, Instituto de Medicina Molecular

Júri:

Presidente: Prof. Doutor
Carlos Salgueiro

Arguente: Doutora Maria Teresa
Ferreira Marques Pinheiro

Vogal: Doutora Patrícia Napoleão

Outubro 2014

Avaliação longitudinal das concentrações solúveis de CD40L e de marcadores hemoreológicos na doença inflamatória aguda

Copyright Sara Maria de Almeida Beijinho, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Quero agradecer em primeiro lugar à minha orientadora Patrícia Napoleão por toda a disponibilidade, conselhos e ajuda que me deu no desenvolvimento deste trabalho, que apesar de não ter sido sempre fácil para ela, nunca deixou de estar presente e disponível para qualquer dúvida ou ajuda quando mais precisei. Agradeço também por ter depositado em mim a confiança e o sentido de responsabilidade de realizar este trabalho de forma autónoma e independente. Agradeço também à Prof.^a Doutora Carlota Saldanha por me ter aceite na sua unidade e também por ter estado sempre disponível, dando-me assim a oportunidade de poder desenvolver este projecto de grande interesse.

Um obrigada muito especial para a Teresa Freitas por ter estado sempre disponível para me ajudar, mesmo quando tinha mais mil coisas para fazer nunca. Por tudo o que ensinou no laboratório mas em especial por me ter provado que, apesar de todas as adversidades, desde que façamos o que gostamos tudo se resolve. Obrigada também pela amizade.

Agradeço à equipa médica que colaborou connosco, nomeadamente ao Dr. António Messias, Unidade de Cuidados Intensivos do Hospital Beatriz Ângelo que se disponibilizou a ceder-nos os doentes diagnosticados com sepsis.

Pela companhia e pela disponibilidade e amizade, agradeço ao meu colega Nuno, que sempre que necessário se disponibilizou a ir buscar as amostras.

Agradeço à minha família, que estiveram sempre presentes em todas as etapas da minha vida académica e sempre me apoiaram em todas as minhas decisões. Um especial obrigada aos meus pais que nunca deixaram de acreditar em mim e que sempre me incentivaram a lutar por aquilo que quis e me tornaram na pessoa que sou hoje.

Não posso deixar de agradecer aos meus amigos que também estiveram sempre presentes e disponíveis para tudo. Um obrigada ao meu grande amigo Pedro que esteve sempre presente em todo este trabalho e a quem nunca faltaram palavras para me incentivar.

Por último quero agradecer à Monica, que esteve sempre do meu lado, mesmo quando as coisas não corriam como queria, e que me ajudou em tudo o que precisei, prescindindo do tempo para ela para me ajudar a mim.

Resumo

Actualmente a sepsis continua a ser uma das principais causas de morte durante o internamento em Unidades de Cuidados Intensivos (UCI). Apesar dos recentes avanços a nível terapêutico existem ainda lacunas por preencher nomeadamente ao nível da identificação de biomarcadores que permitam um melhoramento do prognóstico tendo em conta a necessidade de identificação de doentes de maior risco. Este estudo foi realizado com o objectivo de contribuir para uma melhor compreensão da influência de alterações na microcirculação na sepsis. Para tal foram analisados diversos parâmetros hemorreológicos, como a deformabilidade e agregação eritrocitárias, NO e GSNO eritrocitário. Foi também avaliada a relação de tais parâmetros com a inflamação e trombose através da avaliação da concentração sérica de sCD40L. O estudo incidiu sobre doentes com choque séptico (n=22) e indivíduos saudáveis (n=34). Os doentes com sepsis foram monitorizados na admissão na UCI, 24 e 72 horas depois. Verificaram-se variações longitudinais nos valores de agregação eritrocitária, cujos valores aumentam ao longo do tempo de internamento, até atingirem às 72h valores significativamente diferentes do grupo controlo. Uma tendência inversa apresenta os valores de GSNO eritrocitário, os quais estão aumentados nos doentes em choque séptico aquando da admissão à UCI, diminuindo para valores semelhantes ao grupo controlo. Observaram-se também variações nas concentrações de sCD40L, tendo sido registada uma diminuição ao longo do tempo tornando-se evidente às 72 horas após o internamento. Apesar de preliminares, a comparação entre doentes sobreviventes e não-sobreviventes permitiu inferir uma possível relação do aumento de sCD40L e diminuição de NO e GSNO eritrocitários na admissão com um pior prognóstico. Estes resultados vêm fundamentar a ideia de que existe realmente uma relação entre as alterações a nível da microcirculação e a sepsis.

Termos-chave: inflamação, eritrócitos, hemorreologia, choque séptico, sCD40L

Abstract

Nowadays sepsis is still one of the main death causes during hospitalization in intensive care units (ICU). Despite recent therapeutic advances there are still several gaps to fill, mainly when it comes to the identification of biomarkers which allow an improvement of the prognosis, taking into account the need of identification of high risk patients. The goal of this study is to create a better understanding of the influence of changes in the microcirculation in Sepsis. In order to achieve that a series of hemorheological parameters were analyzed, like the deformability and erythrocyte aggregation, NO and GSNO erythrocyte. An evaluation of the relation of these parameters with inflammation and thrombosis was also conducted, by analysing the serum concentration of sCD40L. The study focused on patients with septic shock (n=22) and healthy subjects (n=29). The patients with sepsis were monitored at the moment of the admission at the ICU, 24 and 72 hours later. The results show an increase in erythrocyte aggregation over time, reaching, at 72h, values significantly higher than controls. The values of erythrocyte GSNO had an inverse trend, since those levels are increased at UCI admission comparing to controls, and decrease over time. The sCD40L serum concentrations also change over time, decreasing over the length of UCI stay becoming evident 72 hours after the hospitalization. Although preliminary the comparison between survivors and non-survivors allow to infer a possible relation of higher levels of sCD40L and lower erythrocyte NO and GSNO, at UCI admission, with a worst outcome. Those results support the idea that there is in fact a connection between the changes in the microcirculation level and the sepsis.

Key words: inflammation, erythrocytes, hemorheology, septic shock, sCD40L

Tabela de conteúdos

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Tabela de conteúdos	ix
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xvi
Abreviaturas	xv
1. Introdução	1
1.1 Inflamação e doenças inflamatórias	1
1.2 Sepsis.....	4
1.2.1 Impacto na saúde mundial	4
1.2.2 Descrição do mecanismo da sepsis	5
1.3 Hemorreologia	8
1.4 sCD40L	11
1.5 Objectivo	13
2. Materiais e Métodos	14
2.1 Caracterização dos grupos de estudo	14
2.1.1 Grupo de Sepsis.....	14
2.1.2 Grupo Controlo	15
2.1.3 Critérios de exclusão	15
2.1.4 Protocolo de recolha de Sangue.....	15
2.2 Métodos	16
2.2.1 Determinação Agregação Eritrocitária	16
2.2.2 Determinação da deformabilidade eritrocitária	16
2.2.3 Determinação de NO eritrocitário.....	17
2.2.4 Determinação da concentração de GSNO.....	17
2.2.5 Determinação quantitativa do ligando de CD40 Solúvel	18
2.3 Análise estatística	19
3. Resultados	20
3.1 Caracterização do grupo de estudo	20
3.2 Comparação dos parâmetros hemorreológicos nos grupos de estudo.....	21
3.3 Comparação da concentração de sCD40L nos grupos de estudo	23
3.4 Variação Longitudinal dos Parâmetros Hemorreológicos	23

3.5 Variação Longitudinal das Concentrações Séricas de sCD40L.....	25
3.6 Estudo da Evolução da Doença.....	25
3.6.1 Comparação dos parâmetros hemorreológicos nos doentes com sepsis consoante o prognóstico.....	26
3.6.2 Comparação das concentrações séricas de sCD40L nos doentes com sepsis consoante o prognóstico.....	27
4. Discussão	29
4.1 Parâmetros Hemorreológicos.....	30
4.2 sCD40L	34
5. Conclusão.....	37
5.1 Limitações do estudo	37
5.2 Perspectivas futuras e implicações.....	38
6. Referências.....	39
Anexo A.....	44
Anexo B	45

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Mecanismo de resposta inflamatória perante antígeno, mobilização de células e mensageiros químicos. (adaptado de Pinto <i>et al.</i> , 2009).....	3
Figura 1.2 - Principais órgãos afectados e efeitos causados com o desenvolvimento de sepsis. (adaptado de Iskander <i>et al.</i> , 2013).....	6
Figura 1.3 - Alterções na microcirculação por efeito da estimulação da produção do NO. (adaptado de http://rjjaramillo.wordpress.com/2012/11/09/sepsis).	9
Figura 3.1 -Comparação da agregação eritrocitária (a 5s e 10s) entre o grupo de doentes com sepsis na admissão na UCI e o grupo controlo.	21
Figura 3.2 - Comparação da deformabilidade eritrocitária a (a 0,6Pa, 6,0 Pa e 30,0 Pa) entre o grupo de doentes com sepsis na admissão na UCI e o grupo controlo.....	22
Figura 3.3 - Variação da concentração de NO e GSNO entre o grupo de doentes com sepsis na admissão na UCI e o grupo controlo.	22
Figura 3.4 - Comparação da concentração de sCD40L entre o grupo de doentes com sepsis na admissão na UCI e o grupo controlo.	23
Figura 3.5 - Variação longitudinal de deformabilidade eritrocitária (a 0.6 Pa, 6.0 Pa and 30.0 Pa) e de agregação eritrocitária (a 5s and 10s) nos doentes em choque séptico nos três tempos de recolha.....	24
Figura 3.6 - Variação longitudinal da concentração de NO e GSNO eritrocitário nos doentes em choque séptico nos três tempos de recolha.	24
Figura 3.7 – Variação longitudinal da concentração de sCD40L em doentes em choque séptico nos três tempos de recolha.....	25
Figura 3.8 - Variação longitudinal de deformabilidade eritrocitária (a 0.6 Pa, 6.0 Pa e 30.0 Pa) e de agregação eritrocitária (a 5s e 10s) em doentes em choque séptico que sobreviveram (a cheio) e não-sobreviventes (a tracejado) nos três pontos de recolha.	26
Figura 3.9 - Variação longitudinal da concentração de NO e GSNO eritrocitário em doentes em choque séptico que sobreviveram (a cheio) e não-sobreviventes (a tracejado) nos três pontos de recolha.....	27
Figura 3.10 - Variação longitudinal da concentração sérica de sCD40L em doentes em choque séptico que sobreviveram (a cheio) e não-sobreviventes (a tracejado) nos três pontos de recolha.	27

Índice de Tabelas

Tabela 3.1- Dados demográficos, fisiológicos e clínicos dos indivíduos incluídos neste estudo.	
IMC - índice de massa corporal.....	20
Tabela B.1 - Parâmetros hemorreológicos do grupo controlo e do grupo de doentes em choque séptico no momento da admissão.	45
Tabela B.2 - Variação longitudinal dos parâmetros hemorreológicos do grupo de doentes em choque séptico.....	45

Abreviaturas

ACh – Acetilcolina

APTT - Tempo de tromboplastina parcial activada

BPM – Batimento cardíaco por minuto

CD40L - Ligando CD40

FiO₂ – Fracção de oxigénio inspirado

GSH - ião Glutatião

GSNO - ião Nitrosoglutatião

HgCl₂ – Cloreto de mercúrio

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

IMC – Índice de massa corporal

INR – Tempo de protrombina

iNOS - sintetase indutível do monóxido de azoto

K₃EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

NaCl – Cloreto de sódio

NO - Monóxido de azoto

Pa – Pascal

Pam – Pressão arterial média

Pas – Pressão arterial superior

pO₂ – Pressão parcial oxigénio

RPM – Rotações por minuto

SaO₂ – Nível de oxigénio saturado

sCD40L - ligando de CD40 solúvel

SIRS - Síndrome de Resposta Inflamatória Sistémica

TF - Factor tecidual

TNF- α - Factor de necrose tumoral alfa

UCI - Unidades de Cuidados Intensivos

1. Introdução

1.1 Inflamação e doenças inflamatórias

A inflamação, a primeira defesa do organismo após ter ocorrido algum tipo de dano a nível tecidual, é uma resposta biológica e fisiológica complexa que envolve diversos componentes vasculares, celulares e uma diversidade de substâncias solúveis. Esta é caracterizada por um conjunto de mecanismos locais que actuam na sua maioria junto à lesão, estando associadas alterações sistémicas que têm como principal objectivo detectar e neutralizar o estímulo indutor da resposta (Pinto *et al.*, 2009).

O processo inflamatório está interligado com o sistema imunológico que é mediado por inúmeros mecanismos reguladores, os quais actuam de modo a que o sistema volte ao estado de equilíbrio e readquira a capacidade reactiva que existia antes do estímulo antigénico. Esta capacidade permite uma resposta imediata a um novo estímulo, caso seja necessário, cumprindo assim o papel fundamental de preservar a individualidade biológica (Vilanova *et al.*, 2007).

A nível do foco inflamatório, a inflamação é também caracterizada pelos seguintes sinais clássicos: rubor (aumento do fluxo sanguíneo), calor (secreção de interleucinas e factores de necrose tumoral), edema (inchaço devido a transudação do plasma), dor (estimulação local das fibras nervosas), ocorrendo também, por conseguinte, a perda de função dos tecidos (Pinto *et al.*, 2009).

Para se manifestarem estes mecanismos de defesa reaccionais, tem de ocorrer vasodilatação, consequência da libertação de mediadores pró-inflamatórios. Assim, é criada uma diferença de pressão entre o espaço intra e extravascular, com diminuição da pressão osmótica sanguínea local, o que, aliado ao aumento da permeabilidade vascular, permite a saída de várias células, nomeadamente leucócitos, para os tecidos perivasculares. Os leucócitos, cuja principal função é defender o organismo contra antígenos, dividem-se em dois grupos: os leucócitos polimorfonucleares (granulócitos) e as células mononucleares (linfócitos e monócitos) (Cardoso, 2007).

Esta resposta inflamatória é uma resposta inata, estereotipada que não depende da origem do estímulo ou da existência de contacto anterior com o mesmo, sendo que os mediadores da mesma constituem uma rede organizada de comunicação e de ampliação de respostas biológicas. Este processo de reacção do sistema imunológico pode sistematizar-se em dois mecanismos de respostas que se encontram intimamente relacionados e funcionalmente são definidos como: a resposta imunológica inata ou natural e a resposta imunológica adaptativa ou adquirida (Pacheco *et al.*, 2007).

A principal diferença entre estes dois mecanismos encontra-se na rapidez e especificidade dos mesmos. A resposta inata consiste numa reacção imediata ao estímulo agressor e os seus mecanismos de reconhecimento possuem uma especificidade de largo espectro. Já a resposta adaptativa é uma resposta mais tardia, e os seus mecanismos de reconhecimento têm uma especificidade mais restrita, ou seja, os receptores dos linfócitos T e B reconhecem antígenos específicos (Schulte *et al.*, 2013).

Embora distintas, tanto a resposta inata como a adquirida, são expressão de um sistema imunológico uno e integrado, composto por células e moléculas solúveis, interagindo e funcionando sinergicamente com o objectivo de eliminar ou neutralizar o estímulo agressor.

A resposta imunológica inata ocorre, como já foi referido anteriormente, devido a uma infecção ou lesão tecidual. De modo a neutralizar esses estímulos exteriores, esta resposta tem como principal mecanismo estimular a inflamação aguda, que consiste na acumulação de leucócitos, proteínas plasmáticas e fluídos derivados do sangue. Os leucócitos e as proteínas plasmáticas são recrutados para o local de infecção, onde desempenham várias funções efectoras, com o objectivo de eliminar os agentes patogénicos e iniciar a reparação do tecido danificado. Embora os macrófagos possam ser a população mais abundante em algumas reacções, os neutrófilos são a classe de leucócitos mais recrutada para actuar quando existe uma produção de estímulos por parte do tecido danificado.

Entre as várias proteínas plasmáticas que são recrutadas durante a resposta inflamatória (fig. 1.1), as mais importantes são as que fazem parte do sistema do complemento, os anticorpos e as proteínas de fase aguda. A mobilização destes componentes no local da agressão, está dependente das mudanças reversíveis dos vasos sanguíneos no tecido infectado ou danificado. Estas mudanças incluem: o aumento do fluxo de sangue para o tecido causado por dilatação arteriolar, como foi acima referido; aumento da aderência de leucócitos ao revestimento endotelial das vénulas; e o aumento da permeabilidade dos capilares e das vénulas face às proteínas plasmáticas e fluidos. Todas estas mudanças são induzidas por citocinas e outras pequenas moléculas mediadoras derivadas de mastócitos, macrófagos e também de células endoteliais em resposta a microorganismos (Vilanova *et al.*, 2007).

A inflamação aguda tanto se pode desenvolver em minutos, como em horas, como chegar a se prolongar durante dias. O processo que ocorre após a inflamação aguda, caso a infecção não seja eliminada ou a lesão do tecido se prolongue, denomina-se inflamação crónica. Neste caso, há o envolvimento, recrutamento e activação de monócitos e linfócitos.

Embora os estímulos causados pela resposta inata possam contribuir para o processo de inflamação crónica, a resposta adaptativa também pode estar envolvida nesse processo, pelo facto de as citocinas produzidas pelas células T serem fortes indutoras de inflamação (Pinto *et al.*, 2009).

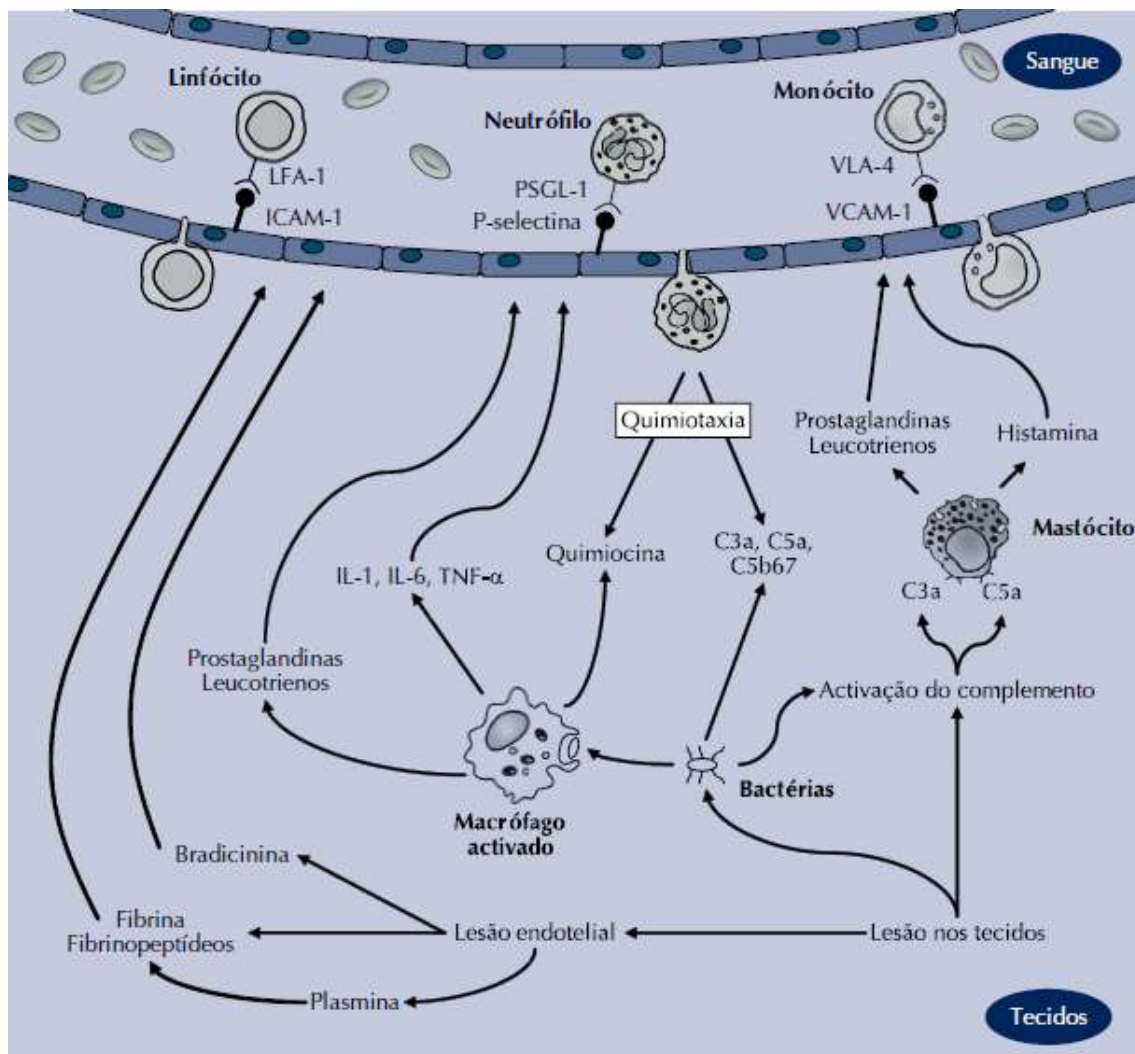


Figura 1.1 – Mecanismo de resposta inflamatória perante antígeno, mobilização de células e mensageiros químicos. (adaptado de Pinto *et al.*, 2009).

As doenças inflamatórias são consequência de uma perpetuação da resposta inflamatória por um período de tempo acima daquele que seria considerado normal para a resolução do problema que desencadeou essa mesma resposta. Por sua vez, podem também ser consequência de uma resposta adaptativa excessiva que se pode traduzir em lesões tecidulares ou, contrariamente à anterior, de uma resposta adaptativa deprimida que beneficia, por exemplo, o desenvolvimento de infecções persistentes. Várias doenças metabólicas (diabetes tipo 2), cardiovasculares e neurodegenerativas constituem alguns exemplos de doenças inflamatórias resultantes dessa perpetuação (Mueller, 2013).

Em resultado de uma resposta inflamatória intensa, pode desenvolver-se uma resposta inadequada contra as células do próprio organismo, dentro dos mesmos sistemas/órgãos, com envolvimento de várias estruturas e células, levando ao dano ou eliminação dos mesmos. Tal facto, surge perante a activação de linfócitos que migram para o local e contactam com as células sequestradores de antígenos. Esta diminuição de tolerância ao “eu” distingue os processos inflamatórios descritos, de processos auto-imunes. Alguns exemplos de doenças auto-imunes são psoríase, vitiligo e artrite reumatóide (Delgado, 2007).

1.2 Sepsis

1.2.1 Impacto na saúde mundial

Várias condições clínicas tais como queimaduras, traumas ou doenças agudas severas, para além do que se verifica na maioria das situações pós-operatórias, podem desencadear uma série de reacções orgânicas de resposta. Este processo é designado de síndrome de resposta inflamatória sistémica (SIRS) (Andrade *et al.*, 2014).

Quando esta síndrome está associada um processo infeccioso, é definida como sepsis ou septicémia. A sepsis pode ser dividida em três classes de acordo com a severidade do quadro clínico apresentado pelo doente: sepsis, sepsis grave ou choque séptico (Martin, 2012).

Epidemiologicamente, existe uma grande variação em relação à incidência de sepsis e sepsis grave nas Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), com índices compreendidos entre os 20 e 80%, registando-se uma taxa de mortalidade de cerca de 20 a 50% dos casos.

Choque séptico é definido como um estado de insuficiência circulatória aguda, caracterizado por hipotensão arterial prolongada com hipoperfusão dos tecidos. Esta classe de sepsis afecta entre 10 a 30% dos doentes internados nas UCI, com progressivo aumento de incidência. A morte causada por choque séptico nas UCI é estimada estar entre os 45 e os 63% (Quenot *et al.*, 2013).

Existem vários factores que condicionam o desenvolvimento da sepsis, sendo a idade do doente um dos mais preponderantes. Embora qualquer indivíduo possa contrair sepsis independentemente da idade, é mais comum estabelecer-se a síndrome em crianças e idosos, uma vez que são os grupos etários com o sistema imunitário menos desenvolvido ou mais debilitado, respectivamente.

Para além disso, um estado de sepsis ocorre particularmente em sujeitos à partida imunodeprimidos – cerca de dois em cada três doentes que desenvolvem sepsis já se encontram significativamente doentes, pelo que o estado de saúde do indivíduo constitui outro dos factores de grande influência no desenvolvimento e na gravidade de um estado séptico. Patologias agudas, como infecção do tracto urinário ou pneumonia; patologias crónicas, como diabetes, hepatopatia, nefropatia ou cancro; condições de supressão imunitária após quimioterapia, tratamento prolongado com corticosteróides ou infecções por retrovírus (HIV); ou casos em que foram introduzidos implantes de dispositivos ou tubos endotraqueais, representam um grande aumento de risco no desenvolvimento de sepsis (Neviere, 2013).

Resumidamente, estudos epidemiológicos têm vindo a demonstrar que o estado de sepsis é uma condição prevalente, que afecta cerca de 20 milhões de pessoas por ano a nível mundial, e que possuiu uma elevada taxa de mortalidade associada. Esta taxa está intimamente ligada à aquisição de resistências por parte de agentes patogénicos a diferentes fármacos. Deste modo, geram-se elevados custos tanto a nível financeiro como social (McDaniel *et al.*, 2013).

1.2.2 Descrição do mecanismo da sepsis

A sepsis é uma doença inflamatória aguda que se pode desenvolver como consequência a condições médicas prévias, tais como infecções respiratórias, do trato urinário, da pele ou da cavidade abdominal (por exemplo, apendicite). Procedimentos médicos invasivos, como a colocação de um cateter vascular, podem conduzir a sepsis iatrogénica (NIGMS, 2013).

A noção de quais são os agentes primários de um processo de sepsis, tem vindo a evoluir ao longo dos anos. Primeiramente, a sepsis era descrita como uma doença relacionada exclusivamente com bactérias Gram-negativas em resposta à produção de endotoxinas. Actualmente, sabe-se que antigénios como bactérias, fungos e vírus, podem estar envolvidos na origem da sepsis, sendo as bactérias os agentes mais prevalentes. Estudos epidemiológicos mais recentes, comprovam que infecções bacterianas, nomeadamente por organismos Gram-positivos, constituem a maior causa de sepsis nos Estados Unidos a partir dos anos 80. Os casos de sepsis causados por fungos têm vindo a aumentar a um ritmo muito elevado. Este facto pode ser consequência do aumento dos casos nosocomiais (infecções hospitalares) de sepsis, bem como reflectir a eficácia de tratamento de infecções bacterianas, o que promove um aumento comparativamente mais significativo de infecções fúngicas (Martin, 2012).

A probabilidade de uma infecção local progredir para sepsis, varia de acordo com o tipo de tecido. Infecções pulmonares e abdominais tem uma probabilidade oito vezes superior de desenvolver sepsis do que infecções do trato urinário. Os principais locais de infecção que levam a sepsis são: pulmões, abdómen, rins e corrente sanguínea (fig. 1.2) (Munford, 2008).

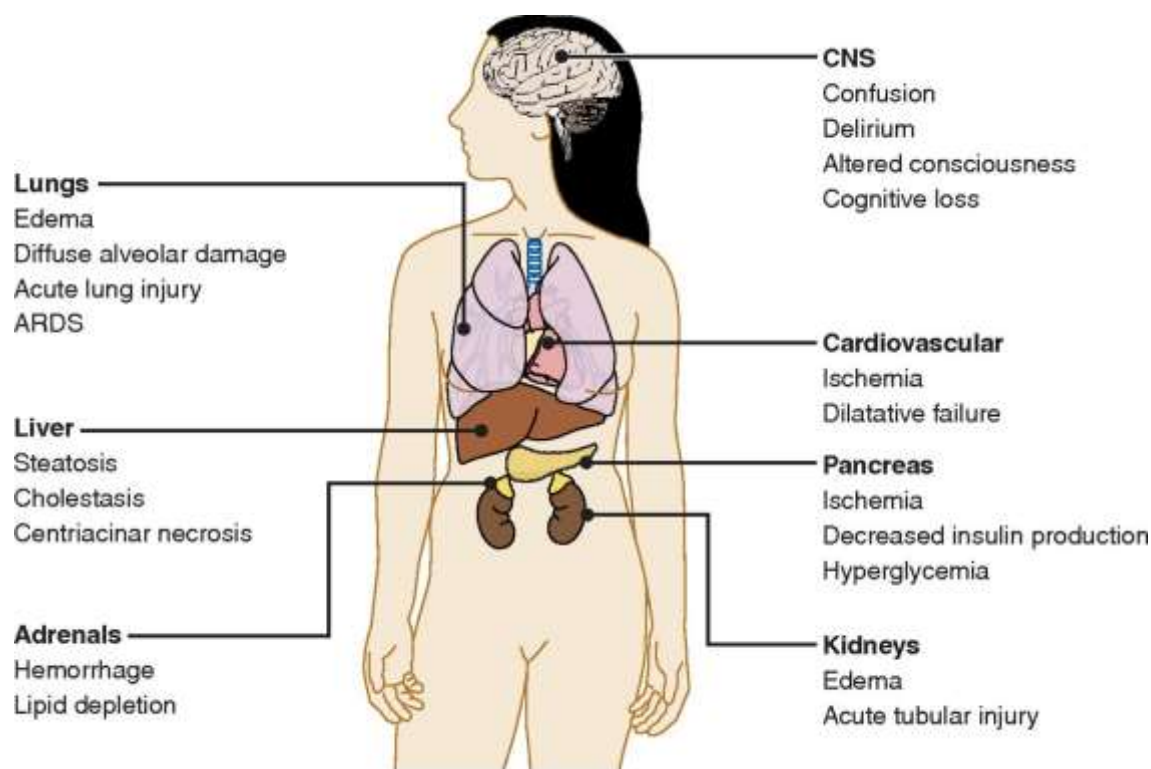


Figura 1.2 - Principais órgãos afectados e efeitos causados com o desenvolvimento de sepsis. (adaptado de Iskander *et al.*, 2013).

Para além do agente etiológico e do sistema/órgão afectado, o estabelecimento de sepsis também depende de factores relacionados com o indivíduo e com o seu sistema imunitário.

Comparativamente a uma reacção inflamatória que se mantém localizada, uma reacção séptica é disseminada através da circulação sanguínea, atingindo vários órgãos e sistemas. Doentes com sepsis apresentam grandes concentrações de moléculas pro-inflamatórias em circulação (De Backer, 2014).

Foi demonstrado que a sepsis é causada por uma amplificação e desregulação da reposta imune inata que leva a um desequilíbrio entre as respostas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias. A resposta inata é a que desempenha um papel mais importante na patofisiologia da sepsis, visto que com a activação deste mecanismo de defesa primário, ocorre uma libertação excessiva de citocinas e outros reguladores inflamatórios.

As citocinas regulam grande parte da resposta inflamatória, nomeadamente a migração de glóbulos brancos até ao foco de infecção. Este mecanismo é crucial, pois contribui para que a infecção se restrinja ao foco primário de lesão, prevenindo que se torne sistémica. Em contrapartida, uma desregulação na libertação de citocinas conduz à vasodilatação e, por sua vez, ao aumento da permeabilidade capilar, o que pode causar hipertensão, hemoconcentração, extravasamento macromolecular e edema, processos recorrentemente encontrados em doentes com sepsis (Schulte *et al.*, 2013).

A disfunção epitelial torna o hospedeiro vulnerável à invasão por parte de agentes patogénicos e dos seus produtos derivados. Assim, são provocados distúrbios nos mecanismos de regulação e, em consequência, disfunção de órgãos vitais (Remick, 2007).

Tradicionalmente, a sepsis era vista como reacção pro-inflamatória sistémica excessiva a uma infecção. Schulte *et al.*, (2013), propôs que a fase inicial do processo de hiper-inflamação é seguida ou sobreposta por um estado de imunossupressão prolongado, denominado imunoparálise induzida por sepsis. Este estado de imunoparelesia é caracterizado por mecanismos deficientes de resposta imunitária inata e adquirida, e pode desempenhar um papel central na lesão tecidual, falência múltipla de órgãos e morte induzida por sepsis.

Em resumo, a sepsis começa como uma resposta inflamatória típica a uma infecção. Como qualquer resposta inflamatória, inicia-se com a mobilização de macrófagos e neutrófilos para o local de infecção e com a activação do sistema do complemento e do sistema de coagulação. De seguida, uma variedade de citocinas pro-inflamatórias é produzida e há formação de edema. Contudo, a reacção séptica diverge de uma reacção normal, uma vez que na sepsis os processos finais da resposta inflamatória fisiológica não se desenvolvem. De acordo com Nevieri (2013), a sepsis tem vindo a ser referenciada como um processo inflamatório intravascular maligno. Inflamatório, pois todas as características de uma reacção séptica são exacerbadas relativamente a uma resposta inflamatória recorrente; intravascular, uma vez que ao contrário da interacção normal célula-a-célula no espaço intersticial, propaga-se pela corrente sanguínea; e maligno, dado que é um processo descontrolado, desregulado e auto-sustentável.

Estudos realizados sugerem que a morte causada por sepsis ocorre maioritariamente devido a falência de vários sistemas de órgãos, em prol da disfunção de um sistema de órgãos em particular (maioritariamente do sistema cardiovascular, respiratório ou sistema nervoso central) (Vincent *et al.*, 2011).

1.3 Hemorreologia

Entende-se por microcirculação uma rede de pequenos vasos sanguíneos que incluem arteríolas, capilares e vénulas, os quais garantem a perfusão dos tecidos (Hernandez *et al.*, 2013). Diversos estudos experimentais realizados anteriormente demonstraram que a sepsis induz alterações na microcirculação, existindo uma diminuição da densidade capilar, associada ao aumento da heterogeneidade da perfusão. Tal sucede devido à presença de capilares não perfundidos, próximos de capilares perfeitamente perfundidos. Estas alterações durante a sepsis podem ser explicadas através de diversos mecanismos, nomeadamente através da disfunção endotelial (Shapiro *et al.*, 2014). De Backer (2014) demonstrou que, a reactividade do endotélio em relação a substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras, diminui durante a sepsis, o que tem efeito sobre a regulação da microcirculação sanguínea.

As células em circulação na corrente sanguínea também cumprem um papel fundamental nestas alterações, nomeadamente os eritrócitos. Os eritrócitos são anucleados e ricos em hemoglobina. São o componente com maior influência e maior proeminência na fase celular do sangue ao nível do sistema circulatório, particularmente ao nível da microcirculação. Os eritrócitos têm como função principal facilitar o transporte de oxigénio e dióxido de carbono para os tecidos. De modo a garantirem a sua sobrevivência no ambiente hostil da circulação, os eritrócitos possuem a capacidade de se deformarem rapidamente, mantendo a membrana equilibrada quando expostos a forças de cisalhamento extremas (Sallisalmi, 2013).

Os eritrócitos desempenham um papel primordial no processo de inflamação sendo que, alterações nos seus parâmetros hemorreológicos, podem indiciar a presença de inflamação.

A deformabilidade é uma propriedade dos eritrócitos que lhes confere a capacidade de se comportarem como corpos elásticos de modo a responderem a pressões aplicadas, isto é, à diminuição do diâmetro dos vasos sanguíneos (como sucede em caso de infecção). Assim, adaptam a sua forma voltando à forma inicial quando a força é removida. A deformabilidade eritrocitária assume um papel fundamental na perfusão de tecidos microvasculares, tendo em conta que os eritrócitos, ricos em oxigénio, necessitam de passar através de microvasos com calibre de três μm . A deformabilidade é o parâmetro hemorreológico com maior impacto, dado que afecta o funcionamento normal do fluxo sanguíneo e perfusão tecidular. Em estados patológicos, como num estado de sepsis, há diminuição da deformabilidade eritrocitária, sendo que o sequestro dos eritrócitos ocorre à entrada dos capilares, aumentando a resistência à perfusão do fluxo sanguíneo microvascular (Piagnerelli *et al.*, 2003).

Os eritrócitos têm tendência a formar arranjos lineares sob a forma de moedas empilhadas. A agregação eritrocitária depende da força de cisalhamento aplicada e de como esta actua sobre as células. Um aumento da força aplicada vai diminuir a agregação e por consequência reduzir a viscosidade sanguínea. Alterações na agregação eritrocitária têm vindo a ser reportadas em diversas condições clínicas graves, nomeadamente na sepsis, em que existe um aumento da agregação eritrocitária, que por sua vez pode provocar um aumento na viscosidade sanguínea. Por fim, o aumento da agregação eritrocitária provoca diminuição da perfusão tecidual, devido à diminuição do fluxo sanguíneo na microcirculação (Baskurt *et al.*,2013).

O monóxido de azoto (NO) é um radical livre altamente reactivo formado a partir da oxidação da L-arginina. Esta molécula é responsável por diversos efeitos fisiológicos, entre os quais potenciar a vasodilatação de modo a manter o tónus vascular; e modular vários parâmetros hemorreológicos, tais como aumentar a deformabilidade eritrocitária, reduzir a adesão de leucócitos e plaquetas e aumentar a capacidade de agregação plaquetária. NO é uma molécula chave na auto-regulação vascular. Por exemplo, no choque séptico, citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , a interleucina-1 e os lipopolissacarídeos são estimulados pela produção de NO (fig. 1.3) (Fortin *et al.*,2010).

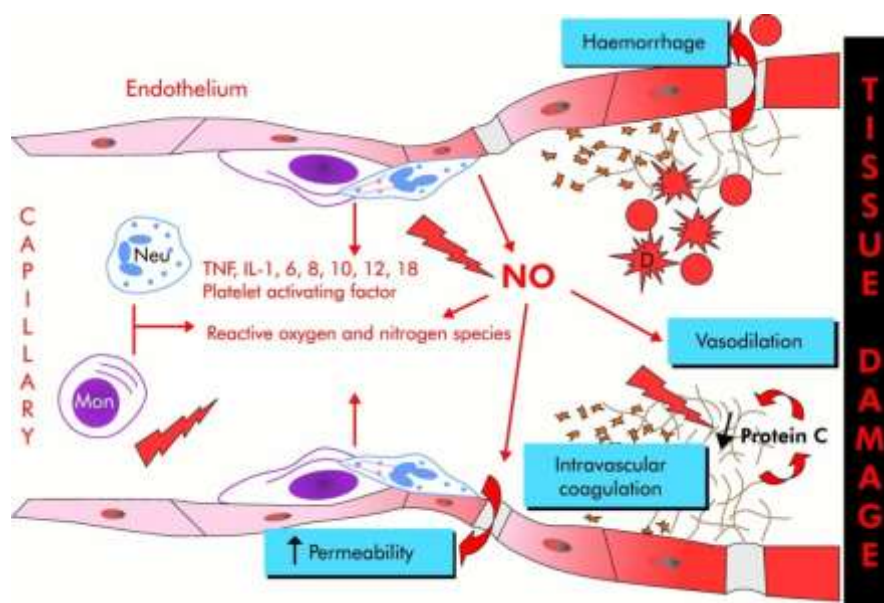


Figura 1.3 - Alterções na microcirculação por efeito da estimulação da produção do NO. (adaptado de <http://rjjaramillo.wordpress.com/2012/11/09/sepsis>).

A sobrerregulação heterogénea de NO sintetase indutível (iNOS), entre e dentro dos tecidos, desencadeia uma diminuição do fluxo sanguíneo, uma vez que os tecidos que carecem de iNOS possuem menos NO. Este processo induz vasodilatação que, por consequência, diminui o fluxo e a perfusão sanguínea a nível dos tecidos.

O NO tem vindo a ser amplamente estudado, e é um componente central na regulação vasomotora dos vasos sanguíneos. A sepsis é caracterizada por um aumento na produção de NO em todo o organismo. O NO é também um importante factor no desenvolvimento do choque séptico. Esta variação na concentração de NO em doentes com sepsis provoca uma diminuição na deformabilidade dos eritrócitos e maior agregação (Ince, 2005).

O nitrosglutatão (GSNO) é uma molécula de baixo peso molecular que desempenha um papel fundamental na sinalização do NO, sendo biologicamente mais estável que este. O GSNO é produto de uma reacção eficiente, rápida e de alto rendimento entre o glutatão (GSH) e o NO (Broniowski *et al.*, 2013).

O GSNO encontra-se presente nos tecidos e nas células em quantidades basais, porém altos níveis do mesmo foram medidos em condições patológicas como isquémia e sepsis.

O GSNO tem vindo a ser amplamente estudado, sendo considerado como uma forma de armazenamento de NO, bem como um componente essencial na transdução de sinal dependente do mesmo. Também se tem despertado interesse acerca do seu potencial carácter terapêutico. As suas características anti-inflamatórias têm vindo a ser demonstradas em várias doenças, nomeadamente na sepsis (Corti *et al.*, 2014).

A GSNO desempenha um papel fundamental na sinalização do NO, sendo também uma molécula biologicamente mais estável que este. As suas características anti-inflamatórias têm vindo a ser demonstradas em várias doenças, nomeadamente a sepsis (Foster *et al.*, 2009).

1.4 sCD40L

Actualmente, está estabelecido que a interacção entre o CD40 e o seu ligando imunomodelador CD40L, está envolvida em mecanismos trombóticos e que pode servir de ligação entre processos inflamatórios e trombóticos (Lorente *et al.*, 2011).

CD40L faz parte da família dos factores de necrose tumoral (TNF), sendo preferencialmente expresso na superfície de células T CD4⁺ activadas, em plaquetas e em outras células como as células imunes, endoteliais e em células das paredes vasculares. Ao ligar-se ao receptor CD40, actua como um activador chave tanto na resposta imunitária inata, como na adquirida. Adicionalmente, esta proteína é clivada da superfície das células activas numa forma solúvel biologicamente activa, sCD40L (Hausding *et al.*, 2013).

Dada a sua importância ao nível da activação celular, o CD40L assume um papel crucial no desenvolvimento e progressão do processo inflamatório. É também um factor chave na activação de células endoteliais, na fisiopatologia da aterosclerose, trombozes, entre outras doenças inflamatórias agudas (Hassan *et al.*, 2012).

O CD40L é armazenado em grânulos α de plaquetas não estimuladas porém, são rapidamente transportados para a superfície das plaquetas quando estas são activadas onde a proteína é clivada e libertada para a circulação sob a sua forma solúvel sCD40L. Esta estabelece ligação com monócitos em circulação através do receptor principal CD40, promovendo a adesão dos mesmos ao endotélio (Chew *et al.*, 2010).

O sCD40L também se liga ao CD40L presente na superfície das células endoteliais. Células endoteliais activas produzem factores transcrpcionais como o factor kappa β , provocando uma sob-regulação de factores pro-inflamatórios e pro-trombóticos. Deste modo, o sCD40L pode ter consequências pro-trombóticas através da indução de TF, atenuando a expressão de trombomodulina e através da ligação de glicoproteínas IIb/IIIa aos receptores das plaquetas. Estes efeitos podem contribuir para o desenvolvimento de trombozes, disfunção endotelial, processos inflamatórios como a sepsis, disfunção de órgãos e por fim morte (Lorente *et al.*, 2011).

Como perspectiva futura, Lorente *et al.* (2011) sugerem que a modulação dos níveis de sCD40L pode representar um alvo terapêutico bastante atractivo na sepsis.

O CD40L desempenha também um papel crucial no desenvolvimento de aterosclerose, predispondo para a rotura e formação de trombos. Assim, o CD40L é expressado maioritariamente pelas plaquetas, tal como descrito num estudo recente que aponta as mesmas como sendo a principal fonte circulante de sCD40L. Deste modo para além do seu valor como índice sistémico de inflamação, o sCD40L também representa um importante indicador de risco trombótico e cardiovascular (Ohashi *et al.*, 2006).

1.5 Objectivo

A sepsis continua a ser uma das principais causas de morte em unidades hospitalares por todo o mundo, particularmente em Unidades de Cuidados Intensivos. Tendo em conta o impacto desta doença a nível mundial, é importante esclarecer onde, quando e como se pode actuar de modo a evitar um desfecho fatal.

O principal objectivo do presente trabalho é contribuir para compreender a influência de alterações na microcirculação na sepsis. Para tal serão analisados diversos parâmetros hemorreológicos, como a deformabilidade e agregação eritrocitárias, NO e GSNO eritrocitário. Será também avaliada a relação de tais parâmetros com a inflamação e trombose através da avaliação da concentração sérica de sCD40L.

De forma a alcançar o objectivo proposto, os doentes com sepsis serão monitorizados na admissão à UCI, 24h e 72h depois, e classificados de acordo com o desfecho à data da alta da UCI em sobreviventes ou não-sobreviventes. Os resultados serão ainda comparados com um grupo controlo constituído por indivíduos saudáveis sem sinais aparentes de doenças inflamatórias.

Pretende-se contribuir para esclarecer o papel da microcirculação na progressão da sepsis, e qual o contributo da hemorreologia e inflamação nesse processo e sua possível relação nas diferentes fases da doença.

2. Materiais e Métodos

Para atingir o objectivo proposto, foram recolhidas amostras de indivíduos com sepsis, os quais foram comparados com um grupo controlo tendo assim sido constituídos dois grupos de estudo.

2.1 Caracterização dos grupos de estudo

Um total de 56 indivíduos constitui os grupos de estudo. De entre estes, 22 constituíram o grupo de estudo de Sepsis, tendo sido recolhidas 34 amostras para o grupo de controlo.

A presente tese beneficiou da integração num projecto de investigação científica em curso no Laboratório Carlota Saldanha do Instituto de Medicina Molecular (IMM), designado “Evaluation of inflammation profiles in septic patients - contribution to multiple cross prognostic biomarkers” (Hospital Beatriz Ângelo/2013).

2.1.1 Grupo de Sepsis

O grupo de sepsis é constituído por 22 doentes (13 mulheres e 9 homens) em choque séptico, admitidos na UCI do Hospital Beatriz Ângelo, Loures. As amostras de sangue foram recolhidas em três momentos diferentes: aquando a admissão na UCI, às 24 e às 72 horas de modo a ser realizado um acompanhamento longitudinal dos doentes em choque séptico durante o internamento.

Os critérios de diagnóstico foram estabelecidos pela equipa médica no âmbito do projecto de investigação clínica acima referido e encontram-se discriminados em anexo (Anexo A).

Todos os doentes incluídos no estudo assinaram um consentimento informado, e o protocolo do projecto foi previamente subtido e aprovado pela Comissão de Ética do Hospital Beatriz Ângelo.

2.1.2 Grupo Controlo

Composto por 34 voluntários saudáveis (5 mulheres e 29 homens). As amostras foram recolhidas de dadores voluntários no Banco Público do Sangue no Instituto Português do Sangue (Lisboa) ao abrigo de um protocolo com o Instituto de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. Este grupo foi constituído com o objectivo de estabelecer valores de referência para os parâmetros estudados.

2.1.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo indivíduos com idade inferior a 18 e superior a 85, mulheres grávidas, indivíduos portadores de VIH ou hepatite B e ainda doentes com diabetes *mellitus* ou insuficiência renal crónica.

2.1.4 Protocolo de recolha de Sangue

As amostras de sangue, tanto dos doentes com sepsis como dos voluntários saudáveis, foram colhidas por punção venosa. Foram recolhidas amostras para 3 tubos de colheita de acordo com os diferentes ensaios realizados: um tubo com anticoagulante heparina 10 UI/ml (1,5 mg/ml), para a determinação dos parâmetros hemorreológicos, um de K₃EDTA para o ensaio de viscosidade plasmática e um tubo seco para a determinação da concentração solúvel de CD40L no soro. Todas as amostras foram processadas num período máximo de 4 hora após a colheita.

As amostras colhidas nos tubos de heparina e K₃EDTA foram transportadas entre os hospitais devidamente acondicionadas à temperatura ambiente, enquanto o tubo seco foi transportado em gelo (4°C).

2.2 Métodos

2.2.1 Determinação Agregação Eritrocitária

Para a determinação da agregação eritrocitária foi utilizado sangue total em heparina, tendo a mesma sido realizada com o auxílio de um agregómetro, *Myrenne Aggregometer MA-1*. Este instrumento aplica e mede a transmissão de luz infravermelha através da suspensão de eritrócitos entre um prato transparente e uma câmara cônica rotativa. Os eritrócitos são inicialmente dispersos pela câmara por acção de uma força de cisalhamento de 600 s^{-1} durante 10 segundos. O aparelho permite obter dois índices adimensionais, um que mede a agregação em condições de estase (M) e outro sob força de cisalhamento muito baixa (M_1) (Vayá, *et al.*, 2013). As medições foram realizadas em triplicado para 5s e 10s de dispersão respectivamente. Posteriormente foi calculada a média para os valores obtidos.

2.2.2 Determinação da deformabilidade eritrocitária

Para determinar a deformabilidade eritrocitária foi utilizado um ectacitometro Rheodyn SSD. Este aparelho determina a deformabilidade dos eritrócitos presentes numa amostra de sangue, contendo anticoagulante (heparina), quando este é adicionado a uma solução de Dextran (solução com alta viscosidade). A mistura é colocada entre um disco estacionário e um disco rotativo (componentes do aparelho). A elevada viscosidade do meio a par com o aumento progressivo da força de cisalhamento exercida, força os eritrócitos a adoptar uma forma elíptica. Consequentemente, esta deformação leva a diferentes padrões de difracção do laser que incide no meio. A intensidade da luz difractada é detectada por quatro sensores ópticos equidistantes situados em dois eixos ortogonais que medem a largura (A) e comprimento (B) da elipse. O software do instrumento calcula o índice de alongamento a cada tensão com o auxílio da seguinte equação $EI(\%) = 100(A-B)/(A+B)$ em que A é a largura e B o comprimento. Este índice é directamente proporcional ao valor de deformabilidade (Rabai, 2012).

2.2.3 Determinação de NO eritrocitário

A determinação de NO eritrocitário foi realizada com base no método descrito por Carvalho *et al.* (2004). Este método baseia-se na medição, em tempo real, das concentrações de NO presentes numa suspensão de eritrócitos utilizando um sensor amperométrico, sensor Amino IV (Innovative Instruments, Tampa, FL). Os autores concluíram que o NO se difunde através da membrana *tripleCOAT* do sensor e seguidamente oxida-se no eléctrodo de platina, obtendo-se assim uma corrente eléctrica. A corrente redox é proporcional à concentração de NO fora da membrana, que é continuamente controlada com o auxílio de um software próprio conectado a um computador.

Na prática, para a determinação da concentração de NO, a amostra de sangue total foi centrifugada tendo sido desprezado o sobrenadante (plasma). À suspensão de eritrócitos foi adicionado NaCl (0,9%, pH7.0) de modo a obter-se um hematócrito de 0,05%. Em seguida, a suspensão é homogeneizada por inversão, e o eléctrodo de NO imerso na mesma. Uma vez estabilizado o eléctrodo, foi adicionado 10 mM de ACh à suspensão, provocando uma alteração na corrente eléctrica.

Esta alteração é proporcional à quantidade de NO presente nos eritrócitos, e com o auxílio de uma curva de calibração previamente calculada, determinou-se os valores de concentração de NO da suspensão. Os valores foram registados à temperatura ambiente e a uma agitação suave.

2.2.4 Determinação da concentração de GSNO

A determinação da concentração de GSNO nos eritrócitos foi realizada segundo o método descrito por Guevara *et al.* (1998) baseado na capacidade do nitrosoglutatão com o reagente de Griess de emitir fluorescência.

Para a determinação da concentração de GSNO foi necessário proceder-se à hemólise da suspensão de eritrócitos. Primeiramente foi adicionada água MILI-Q à suspensão, e esta foi ressuspendida. Em seguida foi adicionado sequencialmente etanol e clorofórmio, e a suspensão foi homogeneizada no vórtex e seguidamente centrifugada a 4000 rpm durante 5 minutos, sendo o sobrenadante armazenado para determinação de GSNO.

Posteriormente, para a quantificação de GSNO, foi preparada uma mistura de reacção contendo 57,7 mM de ácido sulfanílico (constituente B do reagente de Griess) e 7,5 mM de Nedd (constituente A do reagente de Griess), e tampão fosfato pH 7.4 (PBS). Seguidamente foram preparadas diferentes soluções: dois brancos, ambos contendo mistura de reacção e apenas um contendo solução de HgCl₂ em dimetilsulfóxido, e duas outras soluções, ambas

contendo o sobrenadante hemolisado e mistura de reacção na presença e na ausência de HgCl_2 em dimetilsulfóxido de modo a obter uma concentração final de 100 mM.

As soluções foram agitadas suavemente por inversão e incubadas no escuro durante 20 minutos. Posteriormente foi lida a absorvância das amostras no espectrofotómetro (Spectronic 20 Genesys) a 490 nm contra a solução de branco que não continha HgCl_2 . A concentração de GSNO foi determinada de acordo com a curva de calibração previamente obtida.

2.2.5 Determinação quantitativa do ligando de CD40 Solúvel

A quantificação de CD40L solúvel (sCD40L) foi realizada usando o método de imunoensaio enzimático ELISA, com o auxílio de um *kit* comercialmente disponível (R&D Systems, USA). Resumidamente, neste método um anticorpo policlonal específico para sCD40L foi imobilizado numa microplaca de 96 poços e ir-se-à ligar a qualquer sCD40L que esteja presente nas amostras ou controlos com que entre em contacto. Segue-se um passo de remoção das substâncias não-ligadas, adicionando-se posteriormente aos poços um anticorpo policlonal específico para sCD40L conjugado a um enzima. Após nova lavagem para remoção de qualquer reagente anticorpo-enzima não ligado, foi adicionada uma solução de substrato aos poços com o objectivo de obter-se uma coloração de modo proporcional à quantidade de sCD40L ligado no primeiro passo. O processo de desenvolvimento de coloração é parado e a sua intensidade medida por espectrofotometria. O cálculo das concentrações de sCD40L no soro baseia-se na interpolação de uma curva de calibração utilizando o modelo de Boltzmann (sigmóide), de acordo com as instruções do fabricante. Os valores de concentração de sCD40L são expressos em ng/ml.

É de referir que, no presente trabalho, os valores do grupo controlo utilizados para este parâmetro, foram gentilmente facultados pela Doutora. Patrícia Napoleão, correspondendo a um projecto de investigação em curso intitulado “Contribution of circulating microRNA profile to understand the differentiation of patients with acute myocardial infarction based on soluble CD40L levels” (Liga dos Amigos do Hospital de Santa Marta/2013). Nesse âmbito, foram seleccionados 42 indivíduos saudáveis com teste de stresse cardiovascular negativos e ausência de historial de doença coronária ou doenças malignas, bem como presença e/ou historial de doenças infecciosas e inflamatórias.

2.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio dos programas informáticos *SPSS 20.0*, *R2.14.1* e ainda aos *softwares* de análise gráfica *Excel 2010* e *GraphPad Prism 5*.

Os valores obtidos foram considerados estatisticamente significativos para $p < 0,05$.

De modo a comparar os vários parâmetros hemorreológicos e a concentração sérica de sCD40L entre os dois grupos de estudo, controlo e sepsis, foi realizada uma análise paramétrica ANOVA com teste *post-hoc* de Tukey.

Foi realizado um estudo longitudinal com três pontos de recolha de amostras. Num estudo longitudinal, os vários parâmetros medidos no mesmo indivíduo ao longo do tempo não são independentes, pelo que são necessários métodos estatísticos específicos. Deste modo, usou-se um algoritmo de regressão que incorpora as medidas repetidas realizadas. O método estatístico escolhido foi o modelo linear de efeitos mistos (*linear mixed effect model – LME*).

Este modelo estatístico permite descrever as variações longitudinais de cada doente através do cálculo de declives e médias de cada variável em cada tempo de recolha. Assim, permite obter uma estimativa das diferenças nos declives médios entre a admissão ao hospital (0 horas) e os outros pontos de recolha (24 e 72 h), dando uma medida da variação da percentagem dos vários parâmetros medidos no decorrer do tempo de internamento.

3. Resultados

3.1 Caracterização do grupo de estudo

Os dados clínicos, demográficos e fisiológicos referentes aos indivíduos que constituíram o grupo de doentes de sepsis encontram-se discriminados na tabela 3.1. A mesma informação não foi disponibilizada para o grupo de controlo devido ao acordo estabelecido com o Instituto Português do Sangue.

Tabela 3.1- Dados demográficos, fisiológicos e clínicos dos indivíduos incluídos neste estudo. IMC - índice de massa corporal.

	CTR (n=34)	SEP (n=22)
Sexo (f/m)	5/29	13/9
Idade (anos)	-	69±14
IMC (kg/m ²)	-	25±5
Pressão arterial média (mmHg)	-	70±16
Frequência cardíaca (bpm)	-	105±21
Temperatura (°C)	-	37±0,7
Mortes (n(%))	-	3 (100)
Medicação		
Noradrenalina (n(%))	-	22 (100)
Dopamina (n(%))	-	7 (100)
Dobutamina (n(%))	-	8 (100)
Adrenalina	-	8 (100)

Os valores representam a média±desvio padrão, excepto quando indicado.

3.2 Comparação dos parâmetros hemorreológicos nos grupos de estudo

Os resultados obtidos para os parâmetros hemorreológicos e bioquímicos de doentes em choque séptico e do grupo controlo estão representados tabela B.1 do anexo B.

Comparando os valores de agregação eritrocitária, tanto para 5s como para 10s, entre os dois grupos de estudo não se verificam diferenças significativas ($p>0,084$; fig.3.1)

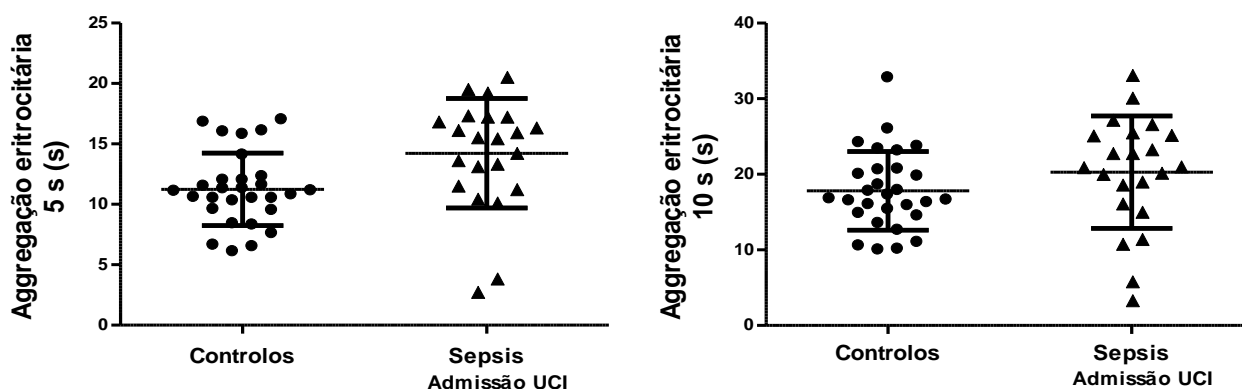


Figura 3.1-Comparação da agregação eritrocitária (a 5s e 10s) entre o grupo de doentes com sepsis na admissão na UCI e o grupo controlo.

Comparando os valores relativos ao parâmetro deformabilidade eritrocitária (para qualquer uma das forças aplicadas, 0,6 Pa, 6,0 Pa ou 30,0 Pa), também não são verificadas diferenças estatisticamente significativas ($p>0,065$; fig.3.2).

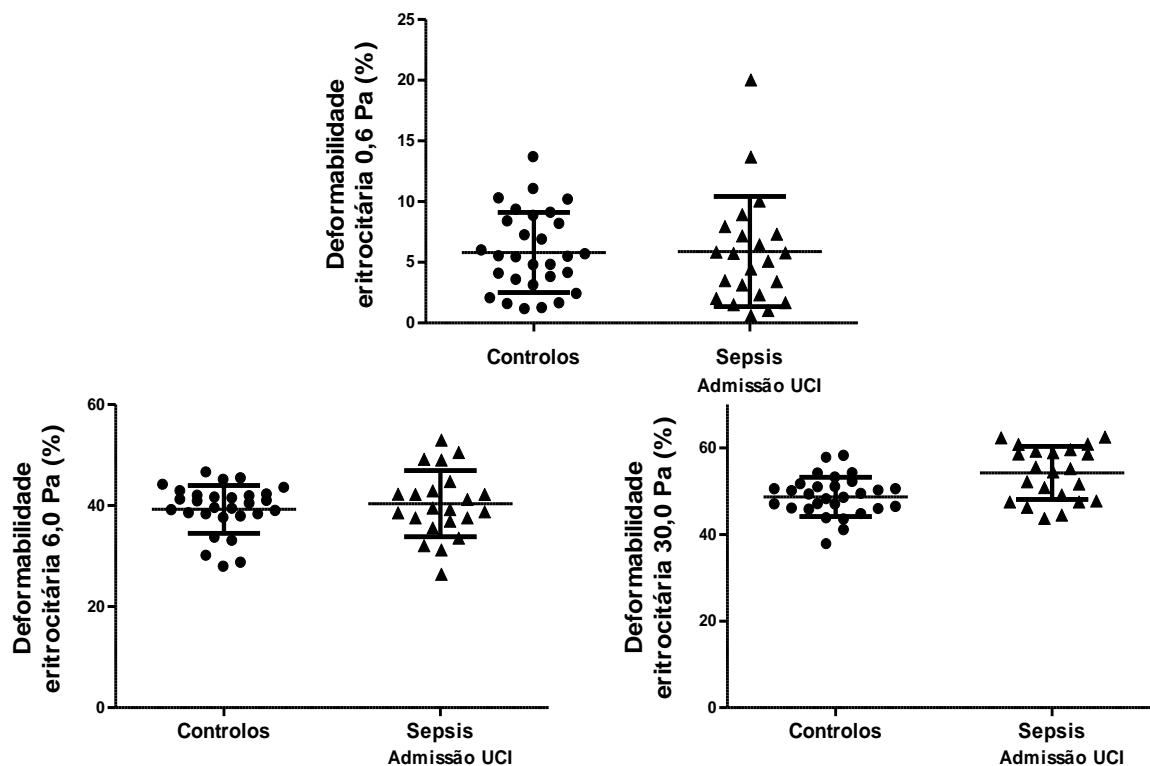


Figura 3.2 - Comparação da deformabilidade eritrocitária a (a 0,6Pa, 6,0 Pa e 30,0 Pa) entre o grupo de doentes com sepsis na admissão na UCI e o grupo controlo.

Relativamente aos valores obtidos nos ensaios de NO e GSNO eritrocitário (fig.3.3), apesar de para o NO não ocorrerem variações entre os dois grupos ($p=0,265$), no caso das concentrações de GSNO verifica-se que os doentes em choque séptico apresentam valores mais elevados comparativamente ao grupo de controlo ($p=0,013$).

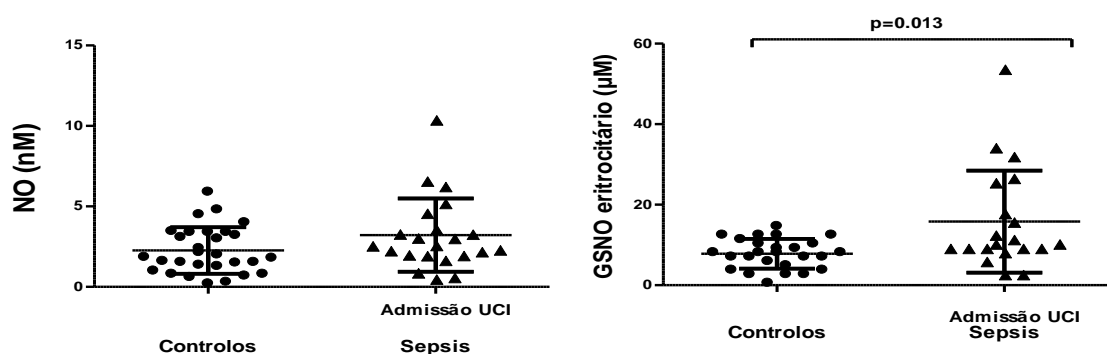


Figura 3.3 - Variação da concentração de NO e GSNO entre o grupo de doentes com sepsis na admissão na UCI e o grupo controlo.

3.3 Comparação da concentração de sCD40L nos grupos de estudo

Em relação aos valores obtidos para a concentração sérica de sCD40L não se verifica diferença significativa entre os dois grupos em estudo ($p=0,163$; fig. 3.4).

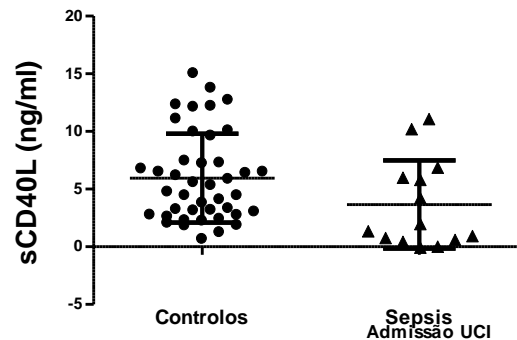


Figura 3.4 - Comparação da concentração de sCD40L entre o grupo de doentes com sepsis na admissão na UCI e o grupo controlo.

3.4 Variação Longitudinal dos Parâmetros Hemorreológicos

A observação longitudinal dos parâmetros hemorreológicos dos doentes com sepsis (Tabela B.2, Anexo B), permitiu constatar que os valores da agregação eritrocitária aumentam ao longo do tempo de internamento, atingindo às 72h valores maiores que o grupo controlo ($p<0,001$ e $p=0,047$) para 5s e 10 s respectivamente (fig.3.5). Foram também observadas diferenças significativas entre os valores de agregação nos três tempos de recolha e os valores dos controlos. Tanto às 24 como às 72 horas após o internamento, os doentes em choque séptico apresentam valores superiores de agregação eritrocitária comparativamente aos controlos. No caso da agregação eritrocitárias a 5s, as diferenças relativamente ao grupo controlo estão presentes logo às 24h ($p=0,001$). No entanto, o modelo de variação longitudinal LME não permitiu verificar essas mesmas diferenças, já que não é significativo ($F>1,95$, $p>0,052$).

Relativamente aos valores da deformabilidade eritrocitária para as diferentes forças aplicadas (0,6 Pa, 6,0 Pa e 30,0 Pa) não foi observada uma variação significativa dos mesmos ao longo do tempo de internamento do doente ($F>0,02$ e $p>0,576$; fig.3.5). Nem tão pouco foram observadas diferenças comparativamente ao grupo controlo ($p>0,084$).

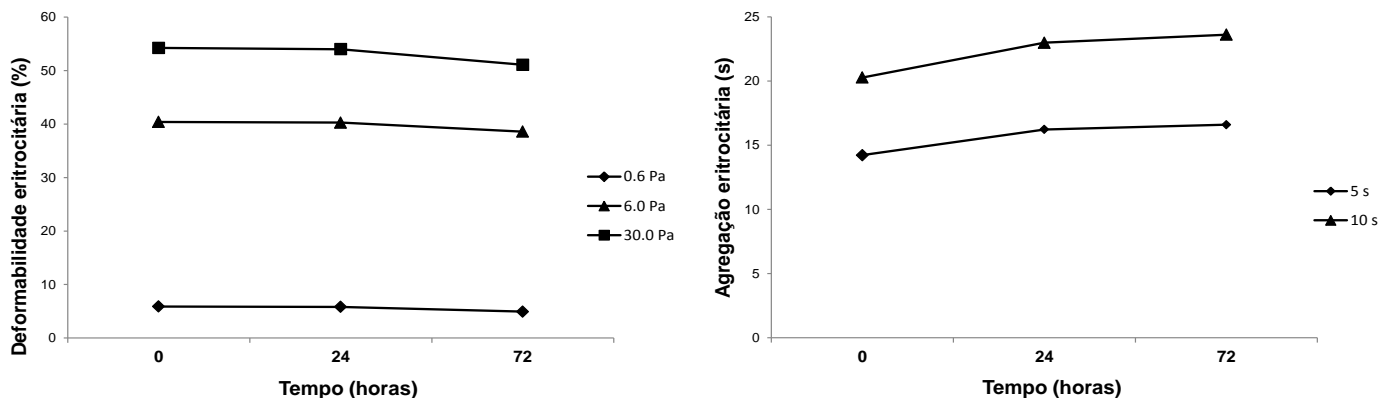


Figura 3.5 - Variação longitudinal de deformabilidade eritrocitária (a 0.6 Pa, 6.0 Pa and 30.0 Pa) e de agregação eritrocitária (a 5s and 10s) nos doentes em choque septico nos três tempos de recolha.

Os modelos de variação longitudinal tanto da concentração de NO eritrocitário ($F=0,97$ e $p=0,388$) como da concentração de GSNO ($F=2,09$ e $p=0,14$) também não são significativos, o que significa que as concentrações destas moléculas não variam ao longo do tempo de internamento (fig.3.6). Também não foram observadas diferenças comparativamente ao grupo controlo ($p>0,474$).

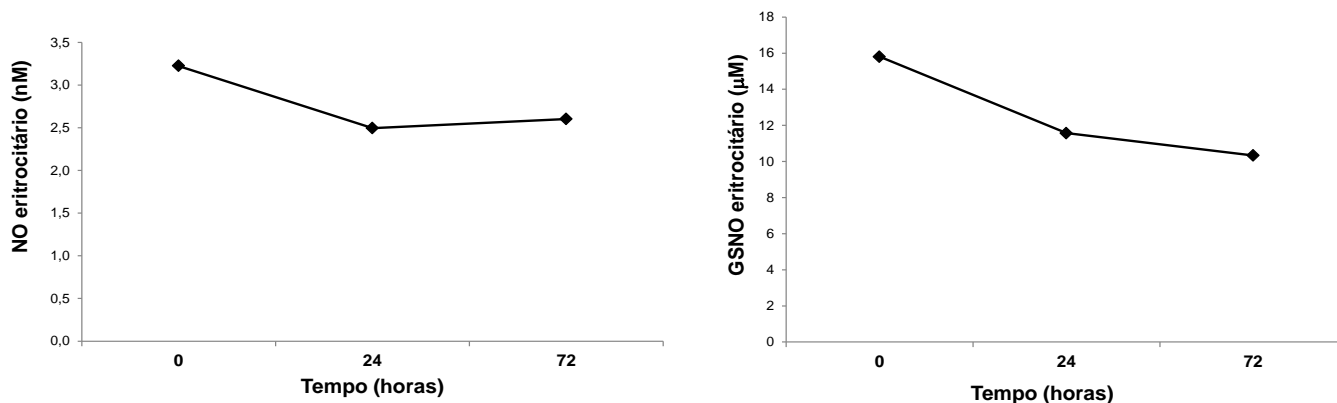


Figura 3.6 - Variação longitudinal da concentração de NO e GSNO eritrocitário nos doentes em choque septico nos três tempos de recolha.

3.5 Variação Longitudinal das Concentrações Séricas de sCD40L

A observação longitudinal das concentrações séricas de sCD40L nos doentes em choque séptico permitiu constatar uma diminuição ao longo do tempo de internamento (fig.3.7). sendo que a mesma mais acentuada às 72 horas de internamento, altura em que as concentrações nos doentes com sepsis são significativamente mais baixas que no grupo controlo ($p=0,007$). No entanto, o modelo de variação longitudinal LME não permitiu verificar essas mesmas diferenças, já que não é significativo ($F=0,90$ e $p=0,422$).

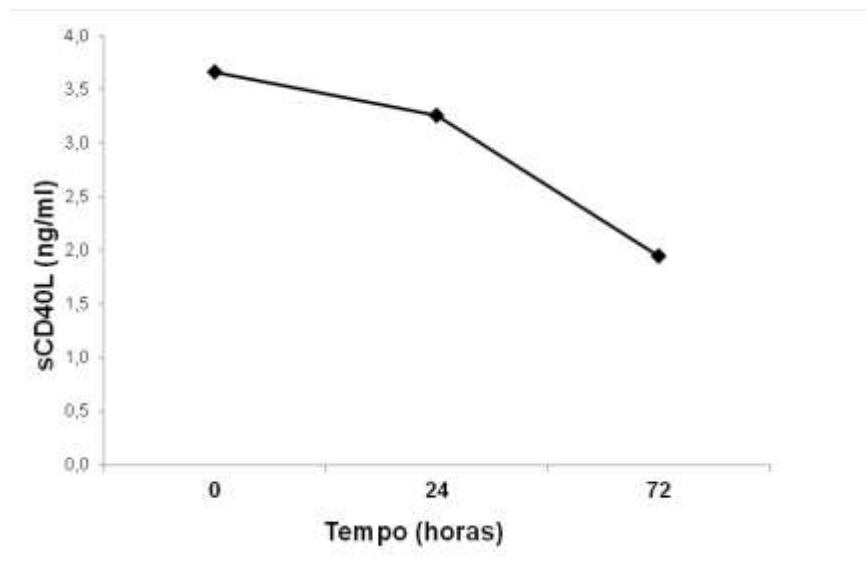


Figura 3.7 – Variação longitudinal da concentração de sCD40L em doentes em choque séptico nos três tempos de recolha.

3.6 Estudo da Evolução da Doença

Dos 22 pacientes em choque séptico internados na UCI, quatro morreram durante o internamento na mesma unidade, tendo sobrevivido em média dois dias na UCI. Os restantes 18, permaneceram em média 13 dias na UCI até à alta.

Dado o reduzido número de doentes classificados como não-sobreviventes não foi possível realizar análise estatística longitudinal, sendo os dois grupos de doentes com sepsis apenas comparados graficamente de seguida.

3.6.1 Comparação dos parâmetros hemorreológicos nos doentes com sepsis consoante o prognóstico

Quando comparados os valores de deformabilidade eritrocitária entre os dois grupos de sepsis (sobreviventes vs. não-sobreviventes), verifica-se que nos doentes não-sobreviventes ocorre uma diminuição significativa às 72 horas dos valores de deformabilidade eritrocitária com forças aplicadas de 0,6 Pa e 6,0 Pa (fig.3.8). Tal diminuição não se verifica para 30,0 Pa. A mesma tendência de diminuição às 72 h ocorre relativamente aos valores de agregação eritrocitária, tanto a 5s como 10s (fig.3.8).

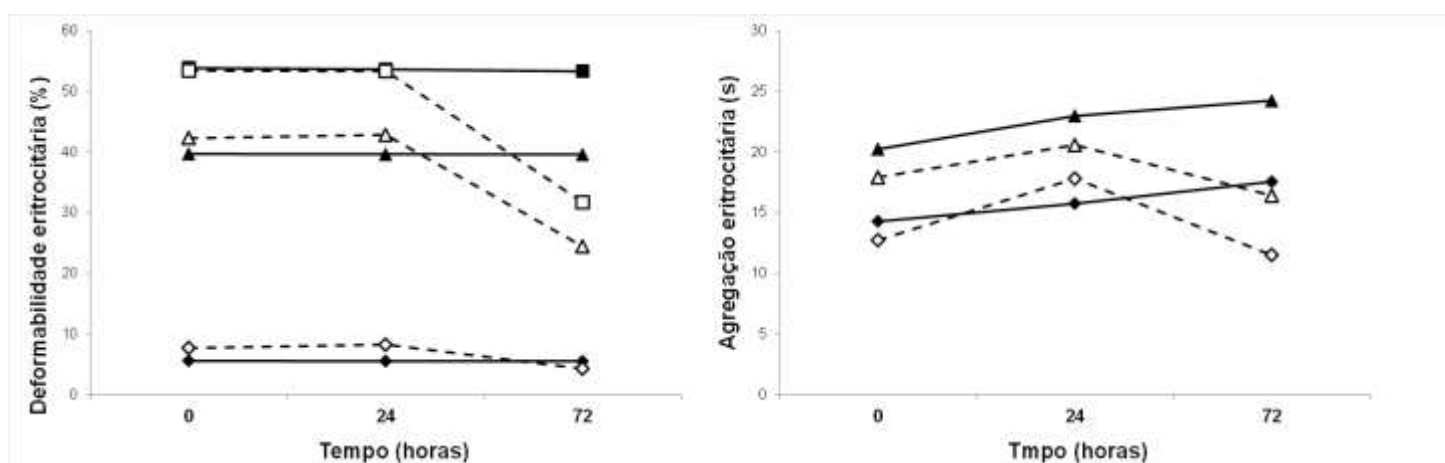


Figura 3.8 - Variação longitudinal de deformabilidade eritrocitária (a 0.6 Pa, 6.0 Pa e 30.0 Pa) e de agregação eritrocitária (a 5s e 10s) em doentes em choque séptico que sobreviveram (a cheio) e não-sobreviventes (a tracejado) nos três pontos de recolha.

Os valores de NO eritrocitário estão diminuídos nos doentes não-sobreviventes na admissão à UCI, havendo a partir das 24h uma aproximação aos valores dos doentes sobreviventes (fig.3.9). Ou seja, relativamente ao NO a diferença maior entre doentes sobreviventes e não-sobreviventes verifica-se na admissão à UCI.

Os valores de GSNO eritrocitário no grupo não-sobreviventes seguem o mesmo padrão (fig.3.9). No entanto, para além da diminuição aquando da admissão à UCI nos doentes não-sobreviventes, verifica-se também uma diminuição dos valores de GSNO às 72h.

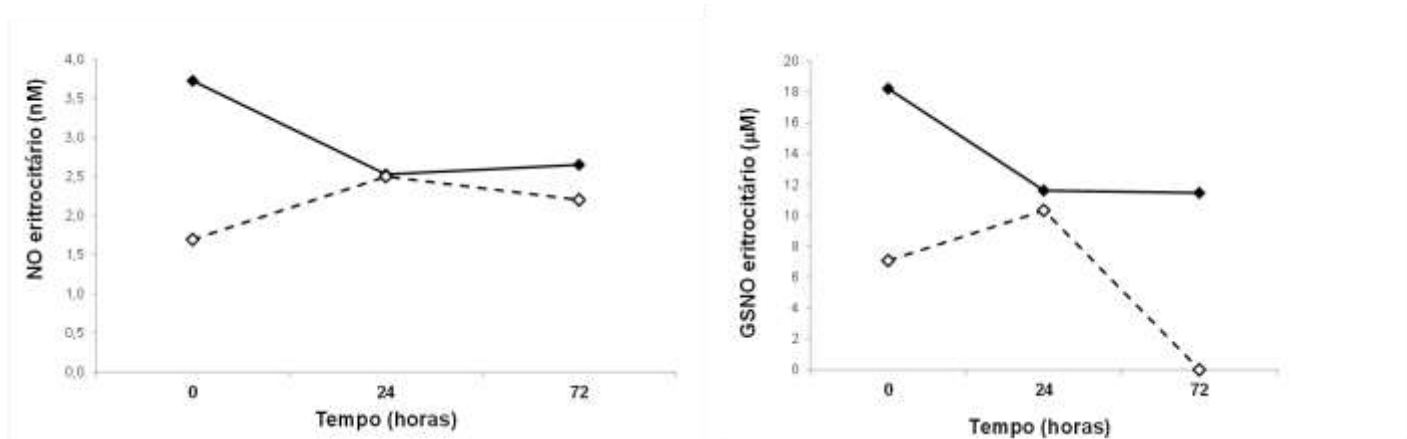


Figura 3.9 - Variação longitudinal da concentração de NO e GSNO eritrocitário em doentes em choque séptico que sobreviveram (a cheio) e não-sobreviventes (a tracejado) nos três pontos de recolha.

3.6.2 Comparação das concentrações séricas de sCD40L nos doentes com sepsis consoante o prognóstico

Na análise de prognóstico dependente da concentração sérica de sCD40L, pode-se afirmar que os valores das concentrações de sCD40L são superiores no grupo de não-sobreviventes na admissão à UCI (fig.3.10).

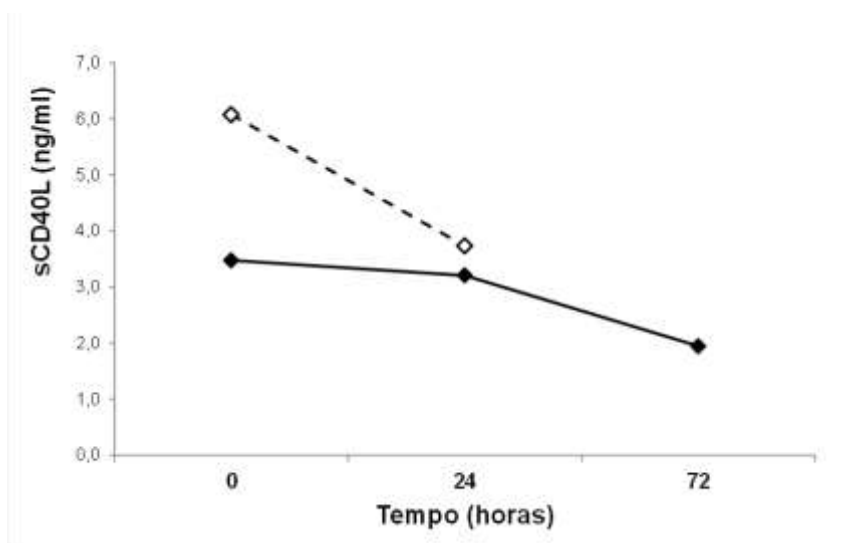


Figura 3.10 - Variação longitudinal da concentração sérica de sCD40L em doentes em choque séptico que sobreviveram (a cheio) e não-sobreviventes (a tracejado) nos três pontos de recolha.

4. Discussão

Actualmente, apesar dos recentes avanços a nível terapêutico, a sepsis continua a ser uma das principais causas de morte durante o internamento em UCI. O choque séptico é responsável por 30-50% das mortes nas UCI (Piagnerelli *et al.*, 2003). Tendo em consideração os vários estudos epidemiológicos já realizados sobre o impacto da sepsis no mundo, é crucial continuar a investigar quais os mecanismos que levam ao desenvolvimento da mesma. Um melhor conhecimento desses mecanismos resultará num diagnóstico mais preciso, que por sua vez contribuirá para uma diminuição da elevada taxa de mortalidade e melhoria do prognóstico.

A sepsis induz alterações na microcirculação, existindo uma diminuição da densidade capilar, associada ao aumento da heterogeneidade da perfusão tecidual. Estas alterações podem ser explicadas através de diversos mecanismos, nomeadamente através da disfunção endotelial. De Backer (2014) demonstrou que a reactividade do endotélio em relação a substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras, diminui durante a sepsis, o que tem efeito sobre a regulação da microcirculação sanguínea. Das alterações geradas a nível da microvascularização, resulta a hipoxigenação celular, com disfunção e consequente falência de tecidos o que conduz, por fim, à morte de múltiplos órgãos (Piagnerelli *et al.*, 2003).

As alterações ao nível da microcirculação ocorrem no início do desenvolvimento da doença e são caracterizadas por, entre outros mecanismos, alterações nos parâmetros hemoreológicos, nomeadamente: agregação e deformabilidade dos eritrócitos e alteração das concentrações de NO e GSNO eritrocitário (Vanina *et al.*, 2011).

No presente trabalho procurou-se estudar essas alterações (bem como o efeito da concentração de sCD40L) em doentes em choque séptico e quais os seus efeitos no prognóstico da doença.

4.1 Parâmetros Hemorreológicos

Foi demonstrado que no decorrer de um processo inflamatório, a capacidade de repulsão dos eritrócitos decresce não só devido à presença de macromoléculas como as proteínas de fase aguda (particularmente o fibrinogénio), como também a alterações nas propriedades celulares inerentes aos próprios eritrócitos (Baskurt *et al.*, 2013; Alt *et al.*, 2004). Segundo Ben Ami, *et al.* (2001), a agregação eritrocitária resultante das alterações nas propriedades celulares, estima-se ser em 35% derivada de doenças inflamatórias severas, entre as quais está enquadrada a sepsis.

Como consequência da diminuição da repulsão, verifica-se um aumento da agregação eritrocitária. Desta forma, ocorre um aumento da viscosidade sanguínea, o que, contribuindo para a hemóstase vascular, promove hipoxia local e lesão endotelial (Piagnerelli *et al.*, 2003).

A alteração deste parâmetro hemorreológico é um dos principais factores característicos da sepsis, como foi comprovado em estudos anteriormente realizados nomeadamente por Piagnerelli (2003), Reggiori (2009), Baskurt (2013), Sallisami (2013) e colaboradores.

No presente trabalho a agregação eritrocitária foi determinada em dois tempos: aos 5 e 10 segundos de dispersão. Em ambas as medições, não se verificaram alterações significativas dos valores de agregação eritrocitária para o grupo de doentes com sepsis no momento da admissão, quando comparados com os valores do grupo de controlo.

Deve-se realçar que a comparação com os valores normais deve ser interpretada com cautela uma vez que a amostra de doentes com sepsis não é uniforme, isto é, a causa da sepsis não é a mesma em todos os doentes. Esta observação aplica-se para todas as comparações efectuadas entre os valores dos parâmetros obtidos na admissão com os valores do grupo de controlo. Nos estudos com modelos animais de sepsis poder-se-á comparar valores de parâmetros em o grupo de controlo e o grupo intervencionado da mesma espécie e estirpe. A comparação dos resultados obtidos aos 5 e aos 10 segundos permitem inferir a rápida capacidade de agregação eritrocitária, dado o aumento deste índice entre a primeira e a segunda medição, respectivamente.

Em relação ao estudo longitudinal, pôde constatar-se que os valores de agregação eritrocitária aumentam ao longo do tempo de internamento (para ambas as medições). Tendo em conta que os doentes se encontram em UCI sob tratamento, seria expectável uma diminuição dos valores de agregação eritrocitária ao longo do tempo, o que se poderia associar à melhoria do estado clínico do mesmo. No entanto há a notar que nesta comparação de incluem doentes com sepsis sobreviventes e não sobreviventes.

Algumas justificações possíveis para os resultados mencionados residem principalmente na dificuldade de controlo da doença. Por um lado, uma vez instalado um estado de sepsis, a libertação de fibrinogénio (que como já foi referido, contribui para o aumento da agregação eritrocitária) pode ocorrer de modo contínuo no decorrer do processo, o que justificaria os resultados obtidos. Por outro lado, a administração de excipientes no tratamento da patologia ao longo do internamento pode ser causa de alterações de propriedades celulares, sendo este outro factor que contribui para o aumento da agregação eritrocitária.

A deformabilidade é a capacidade dos eritrócitos em adaptarem reversivelmente a sua forma durante o fluxo sanguíneo, reagindo a diversas forças aplicadas sobre a sua superfície, dependendo de várias características celulares tais como propriedades relativas à membrana, geometria da célula e à viscosidade citoplasmática (Piagnerelli *et al.*, 2003).

Todas estas propriedades podem ser alteradas perante o desenvolvimento de sepsis (Reggiori *et al.*, 2009). Fisiologicamente, os eritrócitos assumem uma forma bicôncava resultante de uma conjugação de propriedades estáticas e dinâmicas inerentes à membrana celular.

Durante um processo de sepsis, a deformabilidade eritrocitária é um dos parâmetros mais precocemente afectados (Baskurt *et al.* 1998). Através de técnicas de citometria de fluxo, Reggiori e seus colaboradores (2009), constatarem uma rápida alteração na forma dos eritrócitos, tornando-se mais esféricos. Baskurt *et al.* (1998) realizou um estudo, no qual observou que a deformabilidade em doentes com sepsis é menor comparativamente a um grupo de controlo, quando aplicadas forças inferiores a 5 Pa.

Neste estudo, a deformabilidade eritrocitária foi medida aplicando-se três forças de cisalhamento diferentes: 0,6Pa, 6,0Pa e 30,0Pa. Através da comparação dos resultados obtidos para os doentes em choque séptico aquando a admissão, com os do grupo controlo, não foram registadas diferenças significativas dos valores de deformabilidade. Como foi descrito por Reggiori e colaboradores (2009), vários componentes da membrana celular sofrem alterações durante a sepsis, sendo a principal razão de afecção da capacidade dos eritrócitos se deformarem. Assim, demonstraram que o conteúdo membranar em ácido siálico diminui no primeiro dia de estabelecimento de um estado séptico, o que pode contribuir para a fagocitose dos eritrócitos. Outro componente membranar em cuja sepsis tem influência é a porção proteica, registando-se alterações na banda-3, uma proteína membranar dos eritrócitos que desempenha várias funções no metabolismo e morfologia da célula, sendo também reconhecida como essencial para a actividade iónica e glicolítica, estrutura do citoesqueleto e forma da célula. Alterações nesta proteína estão associadas à diminuição da deformabilidade eritrocitária em condições sépticas (Condon *et al.*, 2007). Outros estudos demonstraram que alterações na parte lipídica da membrana também são responsáveis por alterações ao nível da deformabilidade eritrocitária em doentes com sepsis (Reggiori *et al.*, 2009).

Outra hipótese de causa para a disfunção da flexibilidade dos eritrócitos foi proposta por Esper e seus colaboradores (2008), que reportaram diminuição da deformabilidade eritrocitária quando expostos a endotoxinas bacterianas, sugerindo a sua relação.

Longitudinalmente, não foram registadas diferenças significativas nos valores de deformabilidade para as diferentes forças aplicadas ao longo do tempo de internamento. No entanto, e tal como esperado, perante uma força de 0,6 e 6,0Pa, os valores de deformabilidade registados após 72 horas de internamento foram inferiores aos do grupo controlo. Atendendo ao que acima foi alertado, esta diferença, poderia sugerir que, dado o carácter de doença inflamatória severa que é a sepsis, apesar da intervenção médica e terapêutica adequada, é difícil controlar as alterações hemorreológicas associadas à patologia. Seria expectável que, pelo menos após 72 horas de internamento, os valores de deformabilidade estivessem mais próximos dos valores de controlo.

Outro dos parâmetros em estudo neste trabalho que sofre alterações devido ao estado de sepsis é a concentração de NO. O monóxido de azoto é produzido pelas células endoteliais a partir da L-arginina. Num estado séptico, a indução de iNOS é estimulada por lipopolissacarídeos (LPS) e citocinas como o factor de necrose tumoral (TNF) e o interferão γ (INF- γ), o que resulta numa maior produção de NO.

O monóxido de azoto actua sobre a musculatura vascular lisa, promovendo a vasodilatação, portanto aumentando a perfusão sanguínea ao nível dos tecidos, contudo pode contribuir para a hipotensão arterial (Piagnerelli *et al.*, 2003). Assim perante a ocorrência de sepsis o risco de hipotensão arterial é proporcional à quantidade de monóxido de azoto produzida.

No presente estudo, a concentração de NO eritrocitário não apresentou alterações significativas nos doentes com sepsis no momento da admissão, em relação à concentração medida no grupo controlo. Ainda não foram realizados estudos em humanos relativamente ao efluxo de NO eritrocitário em doentes com sepsis, contudo foram realizados estudos em relação ao NO endotelial. Alguns autores justificam o aumento inicial da concentração de NO endotelial como um mecanismo adaptativo, de defesa, induzido pela própria sepsis, ao promover a vasodilatação e assim compensar o fluxo sanguíneo a nível capilar, minimizando a hipoxia celular e portanto, melhorando o prognóstico (Lundy *et al.*, 2011). Fortin e colaboradores (2010) reforçam a importância da elevação inicial de NO endotelial ao clarificarem os seus efeitos antimicrobianos, através da promoção da eliminação de antígenos por células fagocitárias.

Ao longo do internamento em UCI, não foram registadas alterações significativas da concentração de NO nos eritrócitos do grupo de doentes, A biodisponibilidade do eritrócito em NO parece estar salvaguardada na medida em que a ausência de variação sugerindo um estado

estacionário de concentração intraglobular não contribui para o aumento vascular resultante da NO sintase indutível.

Como último parâmetro hemorreológico em que recai o presente trabalho experimental, avaliou-se a concentração de S-Nitrosoglutatão (GSNO), derivado de uma reacção entre o NO e o glutatão (GSH). Sendo importante na integridade da biologia química e funções fisiológicas do NO, o GSNO é referido como forma de armazenamento de NO ou como sinal de transdução dependente de NO. Deste modo, o GSNO é um mediador endógeno essencial para o desenvolvimento do papel biológico do NO. Para além disso, as suas potenciais propriedades terapêuticas também têm sido alvo de investigação (Broniowska *et al.*, 2013).

Em doentes com sepsis verifica-se o aumento da concentração de GSNO que, desta forma, actua como dador de NO e promove a diminuição da deformabilidade eritrocitária (Saldanha *et al.*, 2012).

No momento da admissão em UCI, os doentes com sepsis apresentaram valores de concentração de GSNO superiores aos níveis fisiológicos registados no grupo de controlo. Dada a relação entre os vários parâmetros hemorreológicos descritos anteriormente, níveis elevados de fibrinogénio característicos de um estado séptico, podem justificar o aumento de GSNO aquando a admissão (Saldanha *et al.*, 2012).

Os valores de concentração de GSNO eritrocitário obtidos nas três medições efectuadas ao longo do internamento não apresentam alterações significativas tal como os níveis do NO, o que era previsto dadas as suas funções intimamente correlacionadas.

4.2 sCD40L

O ligando CD40 (CD40L) é um ligando multifuncional pertencente à família dos factores de necrose tumoral. As respostas imunes mediadas por células e imunidade humoral são influenciadas pela interacção do CD40 e o seu ligando. A forma solúvel deste ligando é expressa a partir de plaquetas e células T activadas. A interacção entre o ligando (CD40L) e o receptor (CD40) é responsável pela mediação de uma grande variedade de respostas imunes e inflamatórias.

No presente trabalho, verificou-se que as concentrações de sCD40L são inferiores nos doentes em choque séptico no momento da admissão comparativamente ao grupo controlo. Estes resultados são inversos aos obtidos anteriormente por Chew *et al.* (2010) e Lorente *et al.* (2011), os quais relatam aumento das concentrações de sCD40L em doentes com choque séptico e sepsis grave, respectivamente. Tais discrepâncias relativas ao presente trabalho poderão em parte estar relacionadas com os critérios de inclusão/exclusão dos grupos de estudo.

No estudo de Chew e colaboradores (2010), apenas 7 indivíduos controlo foram incluídos, não tendo sido especificados os critérios de inclusão e/ou exclusão dos mesmos. No segundo estudo, foram incluídos 50 indivíduos saudáveis, mas neste caso apenas foram incluídos doentes com sepsis severa.

Relativamente ao estudo longitudinal, verificou-se um decréscimo das concentrações de sCD40L ao longo do tempo de internamento, nomeadamente entre as 24 e as 72 horas. Para além disso, verificou-se também um aumento das concentrações de sCD40L nos doentes não-sobreviventes logo aquando da admissão à UCI. Estes resultados estão de acordo com publicações anteriores (Nolan *et al.*, 2008 e Lorente *et al.*, 2011).

Enumeras evidências sugerem a sCD40L como um importante elo de ligação entre a inflamação, aterosclerose e a trombose. Diversos estudos observaram o aumento deste em doenças associadas à activação plaquetária (Ivandic *et al.*, 2007).

A sCD40L, como já foi referido, exhibe actividade pro-inflamatória, que inclui a conjugação entre plaquetas e leucócitos, através da sua interacção com o CD40. Assim a sCD40L, através de mecanismos que afectam as células plaquetária, endoteliais e imunes, promove a inflamação, a disfunção endotelial e a destabilização a nível vascular. Tal pode ser comprovado dado que a sCD40L está associada a um prognóstico menos favorável em doenças em que se combina a inflamação e patologias vasculares, como a sepsis (Johansson *et al.*, 2012)

Como também já foi referido, a sCD40L pode ter efeitos pro-trombóticos, provocando a diminuição da expressão de trombomodulina. Este efeito pode impulsionar o desenvolvimento de trombozes (Lorente *et al.*, 2014)

Segundo Lorente *et al.* (2011), embora o papel da sCD40L não esteja completamente explicado, é possível existirem semelhanças entre as funções desempenhadas por esta proteína na sepsis com as que já foram observadas em doentes portadores de doença coronária aguda.

5. Conclusão

A Sepsis representa uma complexa simbiose entre um organismo infectante e a resposta imune do hospedeiro, pode conduzir a vários danos a nível celular e culmina na falência múltipla de órgãos o que, por sua vez, leva à morte do hospedeiro, tornando esta doença uma das maiores causas de morte nas Unidades de Cuidados Intensivos. Como tal, é de extrema importância entender o que difere nos indivíduos cujo prognóstico é positivo em relação àqueles em que o prognóstico é o menos favorável.

De entre os vários indicadores apresentados pelo sangue, no presente trabalho foram escolhidos quatro parâmetros hemorreológicos, sobre cuja avaliação permite inferir acerca do estado de desenvolvimento de um processo séptico. Ao longo do estudo, foi demonstrada a sua importância e caracterizados os critérios de avaliação de cada um desses parâmetros. Os resultados obtidos, vieram, na sua maioria, confirmar estudos anteriormente realizados, o que permite, com alguma segurança, inferir acerca do prognóstico.

Também é preponderante a compreensão da estreita relação entre esses parâmetros e o desenvolvimento do processo inflamatório e trombótico. Para tal, foi medida a concentração sérica de sCD40L. A análise de prognóstico deste parâmetro permitiu associar concentrações mais elevadas deste ligando a taxas de mortalidade superiores.

Em suma, este estudo laboratorial tenta atribuir um valor de diagnóstico importante à mensuração de cinco parâmetros medidos através de técnicas específicas, com vista à determinação precoce de diagnóstico, desenvolvimento de novas técnicas terapêuticas para promoção de disponibilidade de oxigénio celular, e como tal, menor falência de órgãos associada a hipoxia, com o objectivo de melhorar o prognóstico relacionado com sepsis, aquando do ingresso em UCI.

5.1 Limitações do estudo

O principal factor limitante deste estudo foi o número de doentes não-sobreviventes. Apesar da total disponibilidade e esforço por parte da equipa médica, o número de doentes em choque séptico não-sobreviventes incluídos no estudo ficou bastante aquém não foi do desejado.

5.2 Perspectivas futuras e implicações

Tendo em conta a importância da hemorreologia no diagnóstico e prognóstico da sepsis, seria importante continuar este estudo no sentido de melhor relacionar os vários parâmetros hemorreológicos. Como tal, seria importante aumentar a amostragem de modo a obter resultados estatísticos mais fiáveis, nomeadamente no que diz respeito à comparação dos grupos de doentes sobreviventes e não-sobreviventes. Seria importante também poder recorrer a um grupo controlo mais homogéneo, tendo acesso ao seu historial médico e competência imunológica, tal como também seria relevante para o grupo de doentes.

Para uma análise de resultados mais completa e fidedigna, seria relevante, para estudos futuros, incluir a consideração do hematócrito, número de eritrócitos e quantificação do fibrinogénio nos vários pontos de medição em ambos os grupos, pois estes indicadores estão intimamente ligados às alterações hemorreológicas que ocorrem num processo sepsis.

Seria relevante uma medição mais precisa da concentração de NO eritrocitária, dada a sua importância no diagnóstico precoce da sepsis, mas também devido à sua possível importância a nível terapêutico. Para tal poderia ser utilizada a técnica de espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica (EPR) que permite a determinação quantitativa de NO (Kleschov *et al.*, 1996).

6. Referências

- Alt, E., Mann-Vesti, B. R., Madl, C., *et al.* (2004) Platelet aggregation and blood rheology in severe sepsis/septic shock. *Clin Hemorheol Microcirc* 30, pp 107 - 115
- Andrade, J., Gayer, C., Nogueira, N., *et al.* (2014) The effect of thiamine deficiency on inflammation, oxidative stress and cellular migration in an experimental model of sepsis. *Journal of Inflammation* 2014, 11:11
- Baskurt, O.K., Gelmont, D. and Meiselman, H.J. (1998) Red blood cell deformability in sepsis,. *Am J Respir Crit Care Med.* 157(2), pp 421 - 427
- Baskurt, O. K., Meiselman, H. J. (2013) Erythrocyte aggregation: Basic aspects and clinical importance. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 53, pp 23 - 37
- Ben Ami, R., Barshtein, G., Zeltser, D., *et al.* (2001) Parameters of red blood cell aggregation as correlates of the inflammatory state. *Am J PhysiolHeart Circ Physiol* 280, H1982–H1988
- Broniowska, K. A., Diers, A. R., Hogg, N. (2013) S-Nitrosoglutathione. *National Institutes of Health, Biochim Biophys Acta*, 1830(5), pp 3173 - 3181
- Cardoso, E. M. (2007) Células e Órgãos do Sistema Imunológico In: *Fundamentos de Imunologia*. Arosa, F. A., Cardoso, E. M., Pacheco, F. C., Lidel, Lisboa. 1ª ed., pp 19 - 33
- Carvalho, F. A., Martins-Silva, J., Saldanha, C. (2004) Amperometric measurements of nitric oxide in erythrocytes. *Biosen.Bioelect.* 20, pp 505 – 508
- Carvalho, F. A., Maria, A. V., Nogueira, J. M. B., *et al.* (2006) The relation between the erythrocyte nitric oxide and hemorheological parameters. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 35, pp 341 - 347
- Chew, M., Rahman, M., Ihrman, L., *et al.* (2010) Soluble CD40L (CD154) is increased in patients with shock. *Springer, Inflamm. Res.* 59, pp 979 - 982
- Condon, M. R., Feketova, E., Machiedo, G. W., *et al.* (2007) Augmented erythrocyte band-3 phosphorylation in septic mice. *Biochim Biophys Acta.* 1772(5), pp 580 - 586
- Corti, A., Franzini, M., Scataglini, I. (2014) Mechanisms and targets of the modulatory action of S-nitrosoglutathione (GSNO) on inflammatory cytokines expression. *Elsevier, Archives of Biochemistry and Biophysics*

- De Backer, D., Cortes, D. O., Donadello, K. *et al.* (2014) Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock. *Landes Bioscience, Virulence* 5:1, pp 73 - 79
- Delgado, L. (2007) Auto-imunidade In: *Fundamentos de Imunologia*. Arosa, F. A., Cardoso, E. M., Pacheco, F. C., Lidel, Lisboa. 1ª ed., pp 238 – 247
- Esper, R. C., Domínguez, V. C., Córdova, L. D. C., *et al.* (2008) Red blood cell distribution width changes in septic patients. *Asociación Mexicana de Medicina Crítica y Terapia Intensiva*, Vol. XXII, nº1, pp 20 - 25
- Fortin, C. F., McDonald, P. P., Flop, *et al.* (2010) Sepsis, Leukocytes, and Nitric Oxide (NO): An Intricate Affair. *Shock Society*, Vol. 33, nº 4, pp 344 - 352
- Foster, M. W., Hess, D. T., Stamler, J. S. (2009) Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends Mol Med*, Sep;15(9), pp 391 – 404
- Guevara, I., Iwanejko, J., Dembinska-Kiec, A. *et al.* (1998) Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta* 274(2), pp 177 - 88
- Hassan, G. S., Merhi, Y., Mourad, W. (2012) CD40 Ligand: A neo-inflammatory molecule in vascular diseases. *Elsevier, Immunobiology* 217, pp 521 - 532
- Hausding, M., Jurk, K., Daub, S. (2013) CD40L contributes to angiotensin II-induced pro-thrombotic state, vascular inflammation, oxidative stress and endothelial dysfunction. *Springer, Basic Res Cardiol* 108:386
- Hernandez, G., Bruhn, A., Ince, C. (2013) Microcirculation in sepsis: new perspectives. *PubMed, Curr Vasc Pharmacol*. 1;11(2), pp 161 - 9
- Ince, C., *et al.* (2005) The microcirculation is the motor of sepsis. *Critical Care*, 9 (suppl 4):S13-S19
- Iskander, K. N., Osuchowski, M. F., Stearns-Kurosawa, D. J. (2013) Sepsis: Multiple Abnormalities, Heterogeneous Responses, and Evolving Understanding. *American Physiological Society, Physiological Reviews* Published 1 July 2013 Vol. 93 nº 3, pp 1247 – 1288
- Ivandic, B. T., Spanuth, E., Haase, D. (2007) Increased Plasma Concentrations of Soluble CD40 Ligand in Acute Coronary Syndrome Depend on in Vitro Platelet Activation. *Clinical Chemistry* 53:7, pp 1231 - 1234

- Johansson, P. I., Sorensen, A. M., Perner, A., *et al.* (2012) High sCD40L levels early after trauma are associated with enhanced shock, sympathoadrenal activation, tissue and endothelial damage, coagulopathy and mortality. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 10, pp 207 - 216
- Kleschyov, A. L., Münzel, T. (2002) Advanced spin trapping of vascular nitric oxide using colloid iron diethyldithiocarbamate. Elsevier Science. *Methods in Enzymology*, vol. 359
- Lopes de Almeida, JP., Freitas-Santos, T., Saldanha, C., (2012) Erythrocyte deformability dependence on band 3 protein in an in-vitro model of hyperfibrinogenemia. *Clin Hemorheol Microcirc*, 50(3), 213 - 9
- Lorente, L., Martín, M. M., Varo, N., et al. (2011) Association between serum soluble CD40 ligand levels and mortality in patients with severe sepsis. *Critical Care*, 15:R97
- Lundy, D. J., Trzeciak, S. (2011) Microcirculatory Dysfunction in Sepsis. *Crit Care Nurs Clin N Am*, pp 67 - 77
- Martin, G. S. (2012) Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert Review Anti Infect. Ther.* 10(6), pp 701 - 706
- McDaniel, D. O., Rigney, D., Olivier J., et al. (2013) *Trauma Induced Inflammation, Sepsis and Ageing*. Springer Science, Ageing Int
- Moutzouri A., Skoutelis T., Gogos A., *et al.* (2007) Red blood cell deformability in patients with sepsis: A marker for prognosis and monitoring of severity. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 36, pp 291 - 299
- Mueller, K. (2013) *Inflammation's Yin-Yang*. Science Vol. 339. Published by AAAS
- Munford, R. S. (2008). Severe sepsis and septic shock In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*. A. Fauci, et al., 17^a ed. New York: McGraw-Hill Medical National Institute of General Medical Sciences (NIGMS) (2013). Sepsis Fact Sheet. Retrieved June 14, 2013
- Neviere R. (2013). *Pathophysiology of sepsis*. Waltham MA: UpToDate, Inc.
- Nolan, A., Weiden, M., Kelly, A. (2008) CD40 and CD80/86 act synergistically to regulate inflammation and mortality in polymicrobial sepsis. *Am J Respir .Crit Care Med*, 177, pp 301 - 308
- Ohashi, Y., Kawashima, S., Mori, T., et al. (2006) Soluble CD40 ligand and interleukin-6 in the coronary circulation after acute myocardial infarction. Elsevier, *International Journal of Cardiology* 112, pp 52 - 58

- Pacheco, F. C, Cardoso, E. M. (2007) Imunidade Inata e Adaptativa In: Fundamentos de Imunologia. Arosa, F. A., Cardoso, E. M., Pacheco, F. C., Lidel, Lisboa. 1ª ed., pp 35 - 37
- Piagnerelli, M., Boudjeltia, K. Z., Vanhaeverbeek, M, *et al.* (2003) Red blood cell rheology in sepsis, *Intensive Care Med* 29, pp 1052 - 1061
- Pierrakos C., Vincent J (2010) Sepsis biomarkers: a review. *Critical Care* 2010, 14:R15
- Pinto, A., Rosa, M. (2009) Resposta Inflamatória In: Fisiopatologia – Fundamentos e Aplicações. Pinto, A., Lidel, Lisboa. pp 185 - 218
- Quenot, J-P., Binquet, C., Kara, F., *et al.* (2013) The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study. *Critical Care* 2013, 17:R65
- Rabay, M. (2012) In vitro hemorheological studies focusing on erythrocyte deformability and aggregation. Ph. D. dissertation, University of Pecs, Hungria
- Reggiori, G., Occhipinti, G., De Gasperi, A., *et al.* (2009) Early alterations of red blood cell rheology in critically ill patients. *Crit Care Med*, Vol. 37, No. 12
- Remick, D. G. (2007) Biological Perspectives - Pathophysiology of Sepsis. American Society for Investigative Pathology, *The American Journal of Pathology*, Vol. 170, No. 5
- Saldanha, C. (2012) Fibrinogen interaction with the red blood cell membrane. *Clin Hemorheol Microcirc.*
- Saldanha, C., Freitas, T., Almeida, JP. (2012) Fibrinogen effects on erythrocyte nitric oxide mobilization in presence of acetylcholine. *Life Sci*
- Sallisalimi, M. (2013) Microcirculation and hemorheology in critically-ill patients. Academic Dissertation, Medical Faculty of the University of Helsinki
- Schulte, W., Bernhagen, J., Bucala, R. (2013) Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets - An Updated View. Hindawi Publishing Corporation *Mediators of Inflammation* Volume 2013, Article ID 165974
- Shapiro, N. I., Angus, D. C. (2014) A review of therapeutic attempts to recruit the microcirculation in patients with sepsis. *Minerva Anestesiologica* Vol. 80 - nº 2
- Tuinman, P., Juffermans, N., *et al.* (2011) Soluble CD40 ligand, a mediator of sepsis or of transfusion-related adverse effects?. *Critical Care*, 15:429

Vanina, S., Kanoore E., Dubin, A., *et al.* (2011) The Microcirculation as a Therapeutic Target in the Treatment of Sepsis and Shock. *Semin Respir Crit Care Med.* 32(5), pp 558 - 568

Vayá, A., Falcó, C., Fernández, P., *et al.* (2003) Erythrocyte aggregation determined with the Myrenne aggregometer at two modes (M_0 , M_1) and at two times (5 and 10 sec). *IOS Press, Clinical Hemorheology and Microcirculation* 29, pp 119 - 127

Vilanova, M., Ferreira, P. (2007) *Imunologia da Infecção* In: *Fundamentos de Imunologia*. Arosa, F. A., Cardoso, E. M., Pacheco, F. C., Lidel, Lisboa. 1ª ed., pp 193 - 208

Vincent, J-L., *et al.* (2011) Is worsening multiple organ failure the cause of death in patients with severe sepsis?. *Crit Care Med* 39(5), pp1050 – 55

Anexo A

Classificação clínica das classes de sepsis:

a. Critérios de inclusão

O grupo de estudo de sepsis dividiu-se em três grupos: sepsis, sepsis severa e choque séptico definidos como:

Sepsis: Pacientes com Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) causado por inflamação ou suspeita da mesma. Este é definido com pelo menos dois dos seguintes parâmetros descritos abaixo:

- a) Temperatura corporal superior a 38°C ou inferior a 36°C;
- b) Batimento cardíaco superior a 90 bpm;
- c) Frequência respiratória superior a 20 rpm;
- d) Valor de Leucócitos acima dos 12.000/mm³ (ou mais do que 10% de leucócitos imaturos) ou leucopenia inferior a 4.000/mm³.

Sepsis severa: Pacientes que apresentem sepsis e falência de órgãos que estejam dentro de pelo menos um dos parâmetros:

- a) Lactato com valores acima de 18mg/dl;
- b) SaO₂ inferior aos 90% (ou pO₂/FiO₂ abaixo de 300);
- c) PAs (pressão arterial sistólica) abaixo de 90mmHg ou PAm (pressão arterial média) abaixo de 65mmHg;
- d) Creatinina acima de 2mg/dl ou oligúria aguda (fluxo urinário abaixo de 0,5ml/kg/h em duas horas consecutivas);
- e) INR acima de 1,5 ou APTT acima dos 60 segundos;
- f) Contagem de plaquetas inferior a 100.000/mm³;
- g) Bilirrubina total superior a 2mg/dl
- h) Deterioração mental aguda.

Choque séptico: hipotensão persistente apesar de adequada ressuscitação com fluídos;

Anexo B

Tabela B.0-1 - Parâmetros hemorreológicos do grupo controlo e do grupo de doentes em choque séptico no momento da admissão.

Parâmetros Hemorreológicos	CTR (n=34)	SEP Admissão (n=22)
Deformabilidade eritrocitária 0.6 Pa	5,8±3,3	5,9±4,5
Deformabilidade eritrocitária 6.0 Pa	39,3±4,7	40,4±6,5
Deformabilidade eritrocitária 30.0 Pa	48,7±4,5	54,2±6,1
Agregação eritrocitária 5 s	11,2±3,0	14,2±4,5
Agregação eritrocitária 10 s	17,8±5,1	20,3±7,4
NO (nmol/l)	2,3±1,4	3,2±2,3
GSNO (uM)	7,8±3,7	15,8±12,7
sCD40L (ng/ml)	5,9±3,8	3,7±3,8

Os valores representam a média±desvio padrão

Tabela B.2 - Variação longitudinal dos parâmetros hemorreológicos do grupo de doentes em choque séptico.

Parâmetros Hemorreológicos	SEP Admissão (n=22)	SEP 24horas (n=22)	SEP 72horas (n=19)
Deformabilidade eritrocitária 0.6 Pa	5,9±4,5	5,8±4,1	4,9±3,7
Deformabilidade eritrocitária 6.0 Pa	40,4±6,5	40,3±6,8	38,5±11,5
Deformabilidade eritrocitária 30.0 Pa	54,2±6,1	54,0±5,6	51,1±13,6
Agregação eritrocitária 5 s	14,2±4,5	16,2±5,1	16,6±5,2
Agregação eritrocitária 10 s	20,3±7,4	23,0±9,0	23,6±8,3
NO (nmol/l)	3,2±2,3	2,5±1,5	2,6±2,2
GSNO (uM)	15,8±12,7	11,5±6,9	10,3±9,6
sCD40L (ng/ml)	3,7±3,8	3,3±2,9	1,9±1,9

Os valores representam a média±desvio padrão